HAL
open science

Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques : Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien

Jean-Charles Motte

To cite this version:

Jean-Charles Motte. Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques : Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2013. Français. NNT : . tel-02811065

HAL Id: tel-02811065

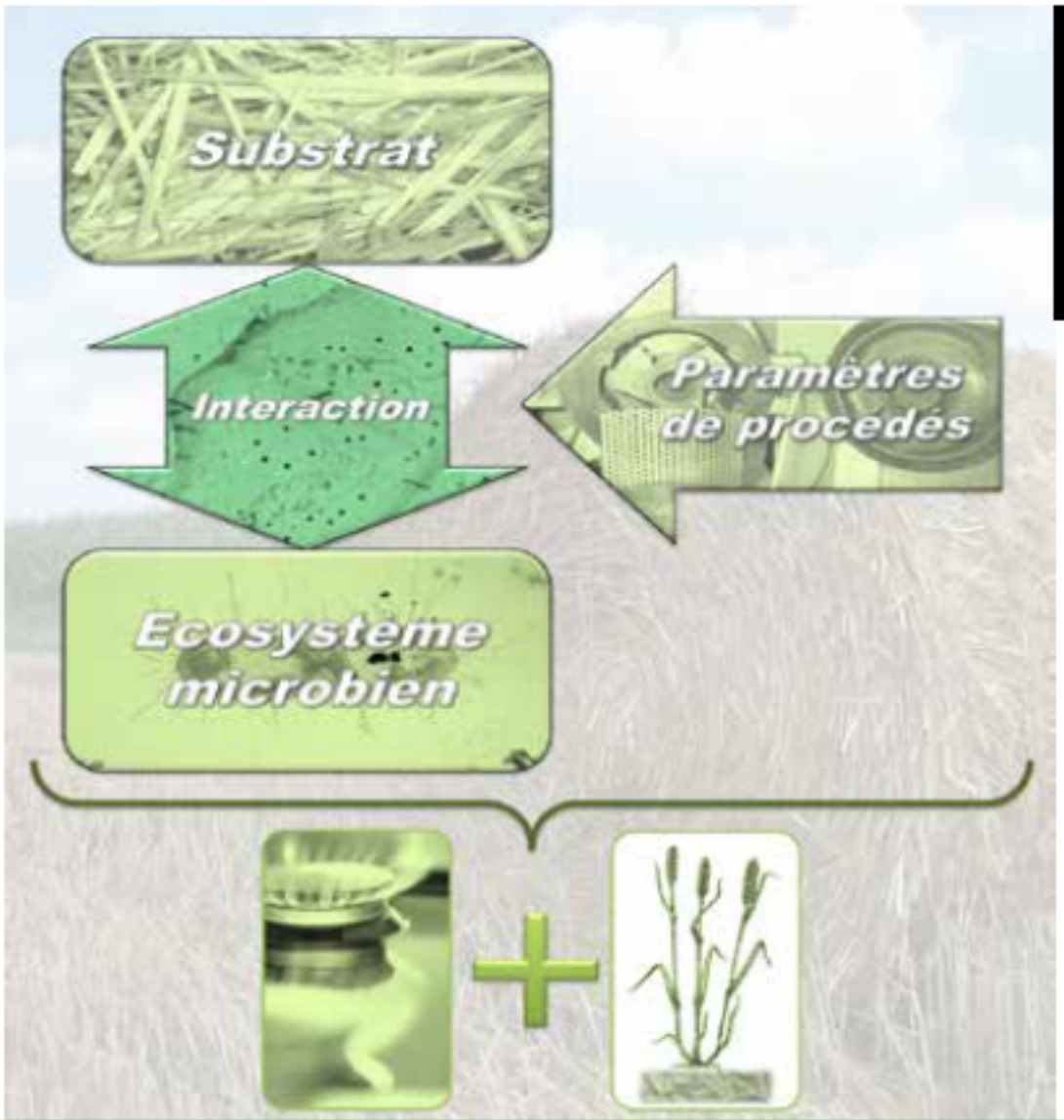
https://hal.inrae.fr/tel-02811065v1

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

JEAN-CHARLES MOTTE



PhD thesis 2013

DIGESTION ANAÉROBIE PAR VOIE SÈCHE DE RÉSIDUS LIGNOCELLULOSIQUES

ETUDE DYNAMIQUE DES RELATIONS ENTRE PARAMÈTRES DE PROCÉDÉS, CARACTÉRISTIQUES DU SUBSTRAT ET ÉCOSYSTÈME MICROBIEN

SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES: DYNAMIC STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PROCESS PARAMETERS, SUBSTRATE CHARACTERISTICS AND MICROBIAL ECOSYSTEM

INRA
SCIENCE & IMPACT

Membre fondateur de
agreenium

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **l'Université de Montpellier II**

Préparée au sein de l'école doctorale SPSA
Et de l'unité de recherche Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA)

Spécialité : **Génie des procédés**

Présentée par **Jean-Charles MOTTE**

Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques :

Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien

Soutenue le 6 Novembre 2013 devant le jury composé de

Mr. **Alain GRASMICK**, Université de Montpellier II	Président du jury
Mr. **Pierre BUFFIERE**, INSA - Lyon	Rapporteur
Mr. **Pierre FONTANILLE**, Polytech'Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mr. **Théodore BOUCHEZ**, IRSTEA - Antony	Examinateur
Mr. **Etienne PAUL**, INSA - Toulouse	Examinateur
Mr. **Jean-Philippe DELGENES**, LBE - INRA Narbonne	Examinateur
Mme. **Claire DUMAS**, LBE - INRA Narbonne	Invitée

Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques : Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien

Les procédés de production de biogaz à faibles teneurs en eau présentent de nombreux avantages économiques et pratiques : consommations énergétiques réduites, fortes charges d'alimentation, peu de post-traitements des digestats… Ce constat a permis de développer à grande échelle la digestion par voie sèche des résidus lignocellulosiques, tels que les pailles de céréales. Cependant, l'optimisation de ces digesteurs est actuellement limitée par un manque de connaissances fondamentales. L'objectif de cette thèse est d'optimiser le processus de dégradation par la prise en compte de l'effet des paramètres de procédés sur les interactions entre le substrat et les micro-organismes. Des stratégies originales et des outils d'analyses innovants ont été développés pour permettre une étude précise des milieux secs. Les résultats montrent que la teneur en eau est le paramètre principal pour contrôler le procédé, tandis que le démarrage dépend de la quantité de micro-organismes. De plus, malgré un risque accru de dysfonctionnement du procédé lorsque les substrats sont broyés finement, ce prétraitement est recommandé pour faciliter l'action microbienne.

Solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic residues: Dynamical study of the relationship between process parameters, substrate characteristics and microbial ecosystem

Biogas processes, containing low water content, present many economical and practical advantages: low energy consumption, high loading rate, low digestate post treatments... These observations led to the development at large scale of the solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic residues, such as wheat straw. However, the digester optimization is currently limited by a lack of fundamental knowledge. The aim of this thesis is to better optimize the process degradation taking into account the effects of process parameters on the interaction between the substrate and the micro-organisms. Original strategies and innovative analytic tools were developed to allow a precise study of dry media. Results showed that water content is the main parameter that controls the process, while its start-up depends on the quantity of micro-organisms. Moreover, despite a higher risk of process failure, fine milling of the lignocellulosic residues is recommended to improve the microbial action.

DISCIPLINE : Génie des procédés

MOTS-CLES : Digestion anaérobie par voie sèche ; Paramètres de procédé ; Résidus lignocellulosiques ; Dynamique réactionnelle ; Ecosystème microbien ; Paille de blé

KEYWORDS : Solid-state anaerobic digestion; Process parameters; Lignocellulosic residues; Reaction dynamics; Microbial ecosystem; Wheat straw

INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne

RESUME ETENDU

DIGESTION ANAÉROBIE PAR VOIE SÈCHE DE RÉSIDUS LIGNOCELLULOSIQUES: ETUDE DYNAMIQUE DES RELATIONS ENTRE PARAMÈTRES DE PROCÉDÉS, CARACTÉRISTIQUES DU SUBSTRAT ET ÉCOSYSTÈME MICROBIEN

L'optimisation de la digestion anaérobie par voie sèche est actuellement limitée par un manque de connaissances fondamentales. En particulier, les effets des principaux paramètres de procédé sur la dynamique réactionnelle sont peu connus en digestion sèche : teneur en eau, propriétés du substrat ou taux d'inoculation. Ces conditions opératoires ont des conséquences importantes à l'échelle des micro-organismes par la modification des conditions environnementales locales. Si la relation entre les propriétés des substrats lignocellulosiques et l'activité de la biomasse microbienne est au cœur de la dynamique réactionnelle, elle reste très peu prise en compte lors de l'ajustement des conditions opératoires.

Ce travail vise à comprendre l'impact des paramètres de procédé (teneur en eau, caractéristiques du substrat, taux d'inoculation) sur le développement, la structuration et l'activité des micro-organismes au cours de la digestion sèche de substrats lignocellulosiques, en vue de maitriser le procédé dans son ensemble. La stratégie retenue a consisté à suivre la dégradation de la paille de blé, modèle des résidus agricoles méthanisables, en réacteurs discontinus faiblement inoculés. Quatre séries d'expériences ont été mises en place pour : i) comprendre comment les paramètres de procédés impactent les réactions, ii) étudier le comportement métabolique des micro-organismes à faibles teneurs en eau, iii) déterminer comment les communautés microbiennes se spécialisent selon l'évolution des caractéristiques du substrat au cours de sa dégradation, et enfin iv) valider les résultats par un taux d'inoculation moins contraignant.

Tout d'abord, le criblage des principaux paramètres de procédés (teneur en matières sèches, taille des particules et taux d'inoculation) a montré une évolution progressive de leurs effets au cours de l'avancement de la réaction, sur les processus de digestion. Ensuite, l'étude de la fermentation en voie sèche a permis de montrer, qu'en présence d'eau libre, l'augmentation de la siccité n'impacte pas le métabolisme microbien, mais modifie les équilibres entre les communautés microbiennes. Le recours à un protocole de compartimentation de la biomasse microbienne spécialement développé dans cette thèse a mis en évidence une spécialisation forte et progressive des communautés microbiennes associées à l'hydrolyse du substrat, au cours de sa dégradation. Des observations par microscopie électronique à transmission indiquent que cette modification coïncide avec la dégradation progressive des tissus de la paille en fonction de leur degré de lignification. La mise en évidence de barrières physiques, récalcitrantes à la biodégradation et rarement décrites dans le contexte de la méthanisation, indique que l'accessibilité du substrat est le paramètre principal limitant la réaction. Ces informations suggèrent que le broyage du substrat est un prétraitement de choix en digestion sèche. Cependant, une dernière expérience a montré qu'en voie sèche, un broyage fin limite les gains de performances du procédé par une augmentation des risques d'acidification des digesteurs.

MOTS CLEFS

Digestion anaérobie par voie sèche ; Paramètres de procédé ; Résidus lignocellulosiques ; Dynamique réactionnelle ; Ecosystème microbien ; Paille de blé

EXTENDED ABSTRACT

SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES: DYNAMIC STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PROCESS PARAMETERS, SUBSTRATE CHARACTERISTICS AND MICROBIAL ECOSYSTEM

Nowadays, optimization of solid-state anaerobic digestion is limited by a lack of fundamental knowledge. In particular, the effects of the main process parameters, such as water content, substrate property or inoculation rate, on the reaction dynamics are poorly understood in solid-state anaerobic digestion. In fact, process parameters have consequences at microbial scale by the modification of the local environmental conditions. Nevertheless, even if the relationship between the lignocellulosic substrate characteristics and the microbial activity is a keystone of the reaction dynamics, it is rarely considered for the selection of operating conditions.

This work aims to understand the influence of process parameters (total solid content, substrate characteristics, and inoculation ratio) on the microbial development, compartmentation and activity in order to optimize dry anaerobic digestion of lignocellulosic substrate. The selected strategy consisted in following wheat straw biodegradation, considered as a model of agricultural wastes available for anaerobic digestion, in low inoculated batch reactors. Four series of experiment have been designed to: i) understand the impact of process parameters on the reaction, ii) study the metabolic behavior of microorganisms face to low water content, iii) evaluate the relationship between substrate characteristics and modification of microbial communities and finally iv) confirm the results by higher inoculation rate.

First, a screening of solid-state process parameters (total solid content, particle size and inoculation rate) showed that their effect on digestion process during the reaction progress change progressively. Then, the study of dry fermentation indicated that, when water is free within the media, increasing total solid content has a low impact on the microbial metabolism, but modifies balances equilibriums between microbial communities. Based on a protocol developed to investigate the biomass compartmentation, a strong and progressive specialization of the microbial communities was observed, associated to substrate hydrolysis during its biodegradation. Observations using transmission electronic microscopy indicated that this modification corresponds to a progressive degradation of the straw tissues depending on their lignification degree. Furthermore, the identification of physical barriers, rarely described in anaerobic digestion, suggests that substrate accessibility is the main parameter limiting the reaction. This information suggests that substrate milling can be theoretically a good pretreatment to improve dry anaerobic digestion. However, a last experiment showed that fine milling limits the process performances by a higher risk of acidification in digesters.

KEYWORDS

Solid-state anaerobic digestion; Process parameters; Lignocellulosic residues; Reaction dynamics; Microbial ecosystem; Wheat straw

REMERCIEMENTS

Au terme de ces trois années de passion, c'est avec une certaine nostalgie que je vais clôturer ce chapitre de ma vie. A cette occasion, j'ai une pensée pour les nombreuses personnes sans l'aide ou les encouragements desquels rien de tout cela n'aurait pu être réalisé.

En premier lieu, je tiens à remercier ***Claire DUMAS*** *pour son encadrement tout simplement idéal. Merci beaucoup pour ce temps que tu as consacré à trouver des solutions, répondre à mes questions et relire mes écrits. En me laissant autonome, tout en répondant toujours présente dès que j'en ai eu besoin, ton encadrement m'a permis de m'épanouir et progresser en tant que chercheur.*

Un grand merci aussi à mon deuxième encadrant, ***Renaud ESCUDIÉ****. Je te remercie sincèrement pour ta réactivité, ton aide et tes remarques pertinentes. Ta bonne humeur constante force le respect et a grandement participé à me faire aimer ce métier.*

*Je tiens aussi à remercier mes directeurs de thèse****, Jean-Philippe DELGENES*** *et* ***Nicolas BERNET*** *qui m'ont accordés leur confiance pour réaliser ce sujet. Votre complémentarité et vos conseils judicieux ont fortement contribués à cette thèse. Merci beaucoup pour m'avoir laissé explorer les pistes qui me tenaient à cœur, et de m'avoir offert cette grande opportunité.*

Je remercie aussi les membres du jury, ***Pierre BUFFIERE*** *de l'INSA de Lyon,* ***Pierre FONTANILLE*** *de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand,* ***Theodore BOUCHEZ*** *de l'IRSTEA d'Antony,* ***Etienne PAUL*** *de l'INSA de Toulouse et* ***Alain GRASMICK*** *de l'Université Montpellier II pour leur investissement dans la correction et l'évaluation de ce travail. Merci également aux scientifiques ayant aiguillés mon travail lors des deux comités de thèse :* ***Xavier ROUAU*** *de l'UMR IATE et* ***Ariane BIZE*** *de l'IRSTEA d'Antony. Merci pour votre implication, votre enthousiasme et vos conseils lors de ces réunions.*

Merci aussi à ***Jérôme Hamelin****, du laboratoire de biotechnologie de l'environnement, ayant activement participé à mes travaux en tant que membre du comité de thèse et co-auteur de certains articles. Je te remercie pour ton aide pour déchiffrer la biologie moléculaire, mais aussi pour la co-responsabilité de l'organisation des séminaires internes pendant ces trois années.*

Je tiens aussi à remercier deux scientifiques pour leur aide au cours de la thèse. Je remercie donc ***Eric TRABLY****, du laboratoire de biotechnologie de l'environnement, pour son aide et ses conseils sur les aspects « hydrogène » de ma thèse. Merci aussi à* ***Françoise WATTEAU****, du laboratoire sol et environnement de l'université de lorraine. Ton aide et ton expertise pour la réalisation et l'analyse des observations microscopiques a permis d'apporter une nouvelle dimension à cette thèse.*

Je tiens également à remercier, ***Jean-Philippe STEYER,*** *directeur de laboratoire de biotechnologie de l'environnement pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à ce projet de thèse. Alors, ton défi a-t-il été relevé ?*

Il me tient également à cœur de remercier les techniciens ayant œuvrés à ce travail. Je n'oublie donc pas ***Anaïs BONNAFOUS*** *qui a fait toutes les analyses microbiologiques de cette thèse. Merci pour ta patience extraordinaire et pour ces semaines à passer et repasser mes échantillons à la SSCP ! C'est bon tu peux redormir la nuit les « S », « M », « F » et « G » ne te poursuivront pas!*

*Je pense aussi à **Denis LOISEL** et **Guillaume GUIZARD**, les deux techniciens et co-inventeurs du dispositif de prélèvement. Ces colles et ces fuites mystères nous ont donnés tant de mal alors que la solution était aussi simple… Je remercie également mon stagiaire DUT, **Nicolas BEAUFILS,** qui a réussi à ne pas déprimer après 3 semaine à trier de la paille.*

*Je tiens aussi à remercier **Michel TORRIJOS** et **Audrey BATIMELLI**, qui m'ont proposé d'agrémenter mon CV d'une expérience originale et très enrichissante : l'organisation d'une conférence internationale de l'IWA. Je pense bien sûr à tous les collègues embarqués dans cette longue aventure : **Yannick SIRE**, **Thibaut SAUR**, **Marjolaine HAMELIN**, **Nadine LE THINH** et **Jean-Louis ESCUDIE**. Promis je ne vous en veux pas de ces (très) nombreuses réunions de dernière minutes alors que j'étais en pleine rédaction !*

*J'adresse également des remerciements très chaleureux à ceux avec qui j'ai partagé mon bureau et qui ont égayé ces longues journées de travail : **David JACKOWIACK, Thibaut SAUR, Mohanakrishna GUNDA, Alessandro CARMONA MARTÍNEZ** et **Thierry CONTE.***

Enfin, je souhaiterais remercier tous les membres du LBE qui, par leur bonne humeur, transforment ce laboratoire en un modèle de relations humaines. Pêle-mêle, je tiens donc à remercier : les scientifiques du LBE, les nombreux stagiaires qui se sont succédés ces trois dernières années, les anciens thésards que j'ai harcelés de questions, les nouveaux thésards qui me les ont rendus, et enfin le personnel technique du LBE ainsi que la dream-team pour leur aide au quotidien.

*Puisque la réussite d'une thèse passe aussi par l'entourage familial, je tiens à remercier ceux qui m'ont soutenue durant ces trois ans. Merci beaucoup à mes parents, **Pascal** et **Maryvonne,** que j'essaie de rendre fier au quotidien. Je pense également à ma petite sœur, **Lauriane**, qui reste chaque jour dans mon cœur malgré la distance. A tous les trois, je vous remercie pour votre amour à mon égard et votre courage lors de mes prises de décisions, même si elles se traduisent par un éloignement (uniquement) géographique.*

*Aujourd'hui, je pense aussi aux autres membres de ma famille : **Brigitte** et **Joël** (pas une journée ne se passe sans penser à vous), **Jean-Louis** et **Josiane, Édouard** et mes **grand-mères**. Je pense aussi à ma seconde famille d'adoption: **Nasi** et **Nasa**, **Sorin** et **Elena**, **Alina** et enfin **Marcela**. Un grand merci aux amis fidèles sur qui je peux compter malgré la distance : **Antoine**, **Pierre-Victor**, **Nicolas** et **Philippe**.*

*Enfin, puisque l'on garde traditionnellement le meilleur pour la fin, je tiens à remercier ma femme **Mirela**. Merci infiniment pour ton courage extraordinaire tout au long de ces trois dernières années. Ton amour pour moi, t'a emmené sur des chemins difficiles ponctués de sacrifices, de défaites mais finalement de nombreuses réussites. Si ces trois années ont pu te sembler si difficile, sache que le plus dur est passé et que maintenant nous allons pouvoir préparer notre avenir.*

Je vous remercie tous infiniment !!!

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures *4*

Liste des tableaux *9*

Liste de abréviations *11*

Publications et communications *12*

1 INTRODUCTION **15**

2 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

2.1 Contexte de l'étude ***20***

2.1.1 Digestion anaérobie des résidus lignocellulosiques 20
2.1.2 Méthanisation par voie sèche industrielle 23
2.1.3 Développement de la voie sèche 29

2.2 Ecosystèmes de la méthanisation ***32***

2.2.1 Quatre phases de dégradation 32
2.2.2 Métabolites de la digestion anaérobie 36
2.2.3 Développement microbien en voie sèche 41
2.2.4 Conclusions sur l'écosystème de digestion sèche 46

2.3 Substrat lignocellulosique ***47***

2.3.1 La paille de blé : un substrat modèle 47
2.3.2 Matrice lignocellulosique 48
2.3.3 Hétérogénéités multi-échelles 52
2.3.4 Dégradation de la lignocellulose 59
2.3.5 Biodégradabilité des pailles de blé 61
2.3.6 Conclusions sur l'influence du substrat 68

2.4 Paramètres clés de la digestion sèche ***69***

2.4.1 Configuration 69
2.4.2 Inoculation 71
2.4.3 Température 73
2.4.4 Prétraitements des substrats 74
2.4.5 Teneur en matières sèches 76
2.4.6 Agitation 78
2.4.7 Alcalinité et pH 79
2.4.8 Maintien de l'anaérobiose 79

2.5 Conclusions de la synthèse bibliographique ***81***

3 OBJECTIFS ET DEROULEMENT DE LA THESE **83**

3.1 Contexte ***84***

3.2 Stratégie d'étude ***85***

3.3 Mise en œuvre 85

4 MATERIELS ET METHODES 87

4.1 Préparation du substrat 88

4.1.1 Lot de paille 88
4.1.2 Reduction granulométrique 88
4.1.3 Granulométrie 92
4.1.4 Surface spécifique 92

4.2 Conduite des digesteurs 93

4.2.1 Evaluation du potentiel méthane et hydrogène 93
4.2.2 Digesteurs discontinus en voie sèche 96
4.2.3 Suivi dynamique des digesteurs 98

4.3 Caractérisations physico-chimiques 101

4.3.1 Paramètres globaux 101
4.3.2 Phase liquide 103
4.3.3 Phase solide 104

4.4 Analyses microbiologiques et observations microscopiques 108

4.4.1 Analyses microbiologiques 109
4.4.2 Protocole de compartimentation 111
4.4.3 Observations microscopiques 113

4.5 Analyses statistiques 115

4.5.1 Plan d'expérience 115
4.5.2 Analyse de variance 115
4.5.3 Analyse en composants principales 115

5 RESULTATS ET DISCUSSIONS 117

5.1 Identification des paramètres clés 118

5.1.1 Avant-propos du chapitre 5.1 119
5.1.2 Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion 122
5.1.3 Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion 137
5.1.4 Discussions du chapitre 5.1 152
5.1.5 Conclusions du chapitre 5.1 161

5.2 Effet de la teneur en matières sèches sur l'acidogenèse 163

5.2.1 Avant-propos du chapitre 5.2 164
5.2.2 Total solid content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion 166
5.2.3 Total solid content drives hydrogen production and microbial selection during thermophilic fermentation 180
5.2.4 Discussions du chapitre 5.2 195

5.2.5 Conclusions du chapitre 5.2 203

5.3 Stratégie microbienne de biodégradation de la lignocellulose..... 205

5.3.1 Avant-propos du chapitre 5.3 206
5.3.2 Dynamic observation of lignocellulosic residue degradation under solid-state anaerobic condition 208
5.3.3 Structuration de la biomasse microbienne en digestion sèche 227
5.3.4 Discussions du chapitre 5.3 240
5.3.5 Conclusions du chapitre 5.3 243

5.4 Mise en évidence du fonctionnement dynamique de la digestion sèche 245

5.4.1 Avant-Propos du chapitre 5.4 246
5.4.2 Is substrate milling an adequate pretreatment for solid-state anaerobic digestion? 248
5.4.3 Discussions du chapitre 5.4 265
5.4.4 Conclusions du chapitre 5.4 270

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 271

7 REFERENCES 275

8 ANNEXE 295

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Cycle du blé dans une problématique de retour au sol. 21

Figure 2-2 : Transformation et conservation des matières des résidus lignocellulosiques au cours de la digestion anaérobie. 22

Figure 2-3 : Fonctionnement séquentiel des réacteurs discontinus en méthanisation sèche. 24

Figure 2-4 : Trois principales technologies de digesteurs continus. 25

Figure 2-5 : Concept général des digesteurs à deux étapes. 27

Figure 2-6 : Retard de la recherche fondamentale sur la digestion sèche. 30

Figure 2-7 : Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie. 32

Figure 2-8 : Les flux métaboliques de la digestion anaérobie. 35

Figure 2-9 : Evolution des énergies libres standard des réactions de transformation de l'hydrogène et de consommation de l'acide acétique en fonction des pressions partielles en hydrogène. 39

Figure 2-10 : Milieux poly-phasiques en digestion sèche de résidus solides. 40

Figure 2-11 : Le modèle théorique du biofilm dans les systèmes poly-phasiques non limités en eau. 41

Figure 2-12 : Hypothèse de stratification des biofilms en voie sèche. 42

Figure 2-13 : Composition de la paille de blé vis-à-vis du spectre de substrats lignocellulosiques. 47

Figure 2-14 : Fragment de chaine cellulosique. 49

Figure 2-15 : Principaux monomère et structure typique des hémicelluloses de paille de blé. 50

Figure 2-16 : Structure modèle des lignines de paille de blé. 51

Figure 2-17 : Imbrication des polymères formant le réseau lignocellulosique. 52

Figure 2-18 : Principaux organes du blé présent dans la paille. 53

Figure 2-19 : Fractionnement morphologique de la paille, exprimé en pourcentage massique. 54

Figure 2-20 : Structure histologique d'un entrenœud de blé. 55

Figure 2-21 : Structure des parois cellulaires des pailles de céréales. 56

Figure 2-22 : Broyage optimal vis à vis de la longueur du substrat lignocellulosique. 59

Figure 2-23 : Teneurs en eau, en matières organiques et en matières minérales des pailles de blé. 61

Figure 2-24 : Proportion de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines dans les pailles de blé. 62

Figure 2-25 : Composition en sucres des pailles de blé et degré de substitution des hémicelluloses. 63

Figure 2-26 : Potentiels méthane des pailles de blé issus de la littérature. 66

Figure 2-27 : Production de biogaz en fonctionnement discontinu. 70

Figure 2-28 : Fonctionnement d'un réacteur de type piston. 71

Figure 2-29 : Gamme de températures exploitables en méthanisation. 73

Figure 2-30 : Gamme de tailles de particules étudiées dans la littérature. 76

Figure 2-31 : Bornes de la digestion anaérobie par voie sèche. 77

Figure 3-1 : L'interaction principale entre le substrat et la biomasse microbienne sous contrainte de paramètre de procédé. 84

Figure 3-2 : Stratégie d'étude de la thèse. 86

Figure 4-1 : Homogénéisation du substrat. 88

Figure 4-2 : Broyage à couteau. 89

Figure 4-3 : Préparation des trois granulométries de paille. 90

Figure 4-4 : Observations microscopiques des trois tailles de particules retenues. 91

Figure 4-5 : Méthodologie employée pour le suivi de la production de méthane. 94

Figure 4-6 : Méthode employée pour la préparation et le suivi et des potentiels hydrogène. 95

Figure 4-7 : Photo des dispositifs expérimentaux. 96

Figure 4-8 : Suivi du biogaz par compteur volumétrique. 98

Figure 4-9 : Canne et réacteur de prélèvement. 99

Figure 4-10 : Représentation schématique du traitement des prélèvements. 100

Figure 4-11 : Mesure de la distribution entre eau libre et eau liée. 102

Figure 4-12 : Fractionnement des tissus lignocellulosiques selon Van Soest. 105

Figure 4-13 : Procédure pour l'analyse des communautés microbiennes des échantillons. 108

Figure 4-14 : Exemple d'empreinte moléculaire. 111

Figure 4-15 : Protocole de compartimentation microbienne. 112

Figure 4-16 : Microscopie électronique à transmission. 114

Figure 5-1 : Graphical abstract of the article untitled: "Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion". 123

Figure 5-2: Distribution of wheat straw morphological fractions (mass percentages). 128

Figure 5-3: Principal component analysis of wheat straw morphological fractions based on lignocellulose distribution. 130

Figure 5-4: Cumulative methane production of the 5 morphological fractions reported in Volatile Solid. 132

Figure 5-5: Representation of the 21 standardized variables of the control fraction (Co). .. 135

Figure 5-6 : Comparison between proportion of morphological fraction in wheat straw and their individual contribution to the methane production (BMP) expressed in dry matter (TS). 136

Figure 5-7 : Graphical abstract of the article untitled: "Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion". 138

Figure 5-8: Surface responses of the methane production ($NmL.g_{VS}^{-1}$) at day 273 as a function of S/X ratio and TS content for three particle sizes in term of normalized factors. 147

Figure 5-9: Dynamic variation of the factors coefficients modeling the methane production during the 273 days of the experiment. 149

Figure 5-10: Examples of dynamical variation of methane production rate for 4 experimental conditions. 150

Figure 5-11 : Positionnement de la paille de blé de la thèse vis-à-vis des caractérisations de la littérature. 155

Figure 5-12 : Prédégradation des feuilles liée à la présence de champignons. 156

Figure 5-13 : Profil de production de méthane en voie sèche faiblement inoculé. 157

Figure 5-14 : Evolution des performances de la méthanisation sèche entre la voie humide et la voie sèche. 159

Figure 5-15: Bio-hydrogen production for the TS content tested. 170

Figure 5-16: Distribution of fermentative products and butyric/acetic acid ratio for the six TS contents tested. 171

Figure 5-17: Summary illustration of the observations of the experiment. 177

Figure 5-18 : Graphical abstract of the article untitled: “Total solid content drives hydrogen production and microbial selection during thermophilic fermentation”. 181

Figure 5-19: Effect of TS content on dark fermentation in terms of biohydrogen yield, reaction duration before hydrogen consumption and hydrogen proportion in the biogas.. 185

Figure 5-20: Molar distribution of fermentative products and substrate (straw) conversion for the six TS contents tested. 187

Figure 5-21: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial communities as CE-SSCP profiles. 190

Figure 5-22: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial communities as CE-SSCP profiles based on final *hyd*A genes distribution classified by TS content. 191

Figure 5-23 : Effet de la température sur la conversion du substrat et la production d’hydrogène en fonction de la teneur en matières sèches. 197

Figure 5-24 : Analyse en composantes principales des empreintes moléculaires basées sur le gène 16S. 199

Figure 5-25 : Effet de la teneur en matières sèches sur la digestion anaérobie. 201

Figure 5-26 : Choix des conditions expérimentales en fonction des résultats du plan d’expérience. 207

Figure 5-27 : Graphical abstract of the article untitled: “Dynamic observation of a lignocellulosic residue degradation under solid-state anaerobic condition”. 209

Figure 5-28 : Theoretical cell wall arrangement and corresponding observation in Transmission electronic microscopy. 210

Figure 5-29 : Cumulative methane production during the reaction. 215

Figure 5-30 : Transmission electronic microscopic observation of the initial conditions (day 0). 219

Figure 5-31 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 15% of degradation (day 8). 220

Figure 5-32 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 32% of degradation (day 27). 221

Figure 5-33 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 56% of degradation (day 62). 222

Figure 5-34 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 100% of degradation (day 244). 223

Figure 5-35 : Performances de dégradation au sein de digesteurs faiblement inoculés. 228

Figure 5-36 : Evolution du profil métabolique au fil de l'avancement de la réaction. 229

Figure 5-37 : Evolution des matières sèches, organiques et minérales du milieu..... 231

Figure 5-38 : Profils CE-SSCP des communautés microbiennes en fonction du compartiment et en comparaison des conditions initiales et finales du milieu. 232

Figure 5-39 : Distinction des communautés bactériennes (16S) contenue dans les différents compartiments. 234

Figure 5-40 : Représentation sous forme d'analyse en composantes principales de la dynamique de compartimentation bactérienne (16S) des profils CE-SSCP..... 235

Figure 5-41 : Evolution des profils CE-SSCP des bactéries (16S) du compartiment particulaires. 237

Figure 5-42 : Hypothèse descriptive de la dynamique de dégradation des résidus lignocellulosiques en digestion anaérobie par voie sèche..... 240

Figure 5-43 : Graphical abstract of the article untitled: "Is substrate milling an adequate pretreatment for solid-state anaerobic digestion?". 249

Figure 5-44: Daily biogas production rate for the three fractions. 254

Figure 5-45: Effect of straw particle size on the SS-AD daily methane production. 255

Figure 5-46: Dynamic evolution of fermentative products for the three particles sizes..... 258

Figure 5-47: Principal Component Analysis (PCA) of bacterial communities CE-SSCP profiles including discriminant peaks. 260

Figure 5-48: Initial and final bacterial (16S) CE-SSCP profiles with the corresponding discriminant peaks. 261

Figure 5-49: Principal Component Analysis (PCA) of bacterial communities as CE-SSCP profiles: zoom on efficient conditions (medium and coarse fraction). 262

Figure 5-50 : Intérêt des procédés à deux étapes pour une optimisation de la digestion sèche..... 268

Figure 8-1 : Schéma du prototype..... 297

Figure 8-2 : Diagramme des opérations pour réaliser les prélèvements..... 298

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Intérêts des procédés voie sèche vis à vis de la voie humide. 23

Tableau 2-2 : Réactions métaboliques de la méthanisation. 37

Tableau 2-3 : Abondance des parois cellulaires dans les cellules de la paille de blé..... 57

Tableau 2-4 : Composition des parois cellulaires des principaux tissus. 58

Tableau 2-5 : Composition élémentaire de la paille de blé et prédiction du potentiel méthane. 64

Tableau 2-6 : Caractérisation moyenne des pailles de blé décrites dans la littérature..... 67

Tableau 2-7: Applicabilité des prétraitements de la biomasse lignocellulosique pour la voie sèche..... 74

Tableau 4-1 : Longueurs d'ondes d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier. 106

Tableau 4-2 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR. 110

Tableau 5-1: Morphological composition of wheat straw. 129

Tableau 5-2: Lignocellulosic fractionation based on Van Soest analysis. 131

Tableau 5-3: Biogas potential of the 5 morphological fractions. 133

Tableau 5-4: Control characterization and difference with predicted values. 134

Tableau 5-5: 3^3 Box-Behnken experimental design: observation number, normalized level of independent factors, and correspondence with actual values of factors. 143

Tableau 5-6: Van Soest fractionation, TS and VS content of wheat straw milled at three particle sizes. 144

Tableau 5-7: Observation values of the experimental design at day 273. 145

Tableau 5-8: Calculated coefficients of the main responses of the experimental design at day 273. 146

Tableau 5-9 : Caractérisation des trois tailles de particules. 152

Tableau 5-10 : Analyse élémentaire de la paille de blé. 154

Tableau 5-11 : Synthèse des résultats du chapitre 5.1. 162

Tableau 5-12: Main balance reactions presented in anaerobic microbial fermentation. 168

Tableau 5-13: Distribution of fermentative products for the six conditions tested. 172

Tableau 5-14: Distribution of fermentative products for the six conditions. 173

Tableau 5-15: Pyrosequencing identification of the bacterial communities after 14 days of fermentation for three conditions (10, 19 and 29% TS) and in the pretreated inoculum. ... 193

Tableau 5-16 : Comparaison des performances des fermentations en condition mésophile. 196

Tableau 5-17 : Comparaison des performances des fermentations en condition thermophile. 197

Tableau 5-18 : Synthèse des résultats du chapitre 5.2. 204

Tableau 5-19 : Evaluation of the reaction dynamics along the 6 sampling dates. 216

Tableau 5-20 : Comparaison des profils métaboliques entre le prélèvement au 8ème jour et le milieu en fin de fermentation mésophile à 19% de MS (section 5.2.2)..... 230

Tableau 5-21 : Indicateurs de diversité microbienne en fin de réaction (244ème jour). 233

Tableau 5-22 : Synthèse des résultats du chapitre 5.3. 244

Tableau 5-23: Wheat straw characterization for the three fractions. 253

Tableau 5-24: Process performances for the three fractions at the end of the reaction. 256

Tableau 5-25: Characteristics of the samples during the reaction progress for the three particles size. 257

Tableau 5-26 : Synthèse des résultats du chapitre 5.4. 270

LISTE DE ABRÉVIATIONS

ABREVIATIONS DANS LES PARTIES EN **FRANÇAIS**		ABREVIATIONS DANS LES PARTIES EN **ANGLAIS**	
µGC	Micro-chromatographie en phase gazeuse	µGC	Micro-gas chromatograph
AGV	Acides gras volatils	VFA	Volatile fatty acids
MS	Matières sèches	TS	Total solids
MV	Matières volatiles	VS	Volatile solids
MM	Matières minérales	MM	Mineral matters
BHP	Potentiel hydrogène	BHP	Biohydrogen potential
BMP	Potentiel méthane	BMP	Biomethane potential
DA	Digestion anaérobie	AD	Anaerobic digestion
MET	Microscopie électronique à transmission	TEM	Transmission electron microscopy
DCO	Demande chimique en oxygène	COD	Chemical oxygen demand
S/X	Ratio substrat sur biomasse	S/X	Substrate/microorganisms ratio
ACP	Analyse en composante principale	PCA	Principal component analysis
PCR	Réaction en chaîne par polymérase	PCR	Polymerase chain reaction
CE-SSCP	Électrophorèse capillaire - Polymorphisme de conformation des simples brins	CE-SSCP	Capillary Electrophoresis Single-Strand conformation polymorphism
ANOVA	Analyse de la variance	ANOVA	Analysis of variance
COT	Carbone organique total	TOC	Total organic carbon
NTK	Azote total de Kjeldahl	TKN	Total Kjeldahl Nitrogen
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
w_c	Teneur en eau critique	w_c	Critical water content
ADN	Acide désoxyribonucléique	DNA	Desoxyribonucleic acid
		SS-AD	Solid-State anaerobic digestion

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Motte, J-C., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.144:141-148.*

Motte, J-C., Trably, E., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C. Total solid content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol.Biofuel*s (Soumis en Juin 2013).

Motte, J-C., Escudié, R., Beaufils, N., Steyer, J-P., Bernet, N., Delgenes, J-P., Dumas, C., Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. Ind. Crop. Prod. (Soumis en Juillet 2013).

Motte, J-C., Trably, E., Hamelin, J., Escudié, R., Bonnafous, A., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C. Total solid content drives the hydrogen production and microbial selection in thermophilic fermentation. *Int. J. Hydrogen. Energ.* (Soumis en Septembre 2013).

Motte, J-C., Watteau, F., Escudié, R., Steyer, J-P., Bernet, N., Delgenes, J-P., Dumas, C., Dynamic observation of a lignocellulosic residue degradation under solid-state anaerobic condition. *Energy Environ. Sci.* (Soumission en octobre 2013).

Motte, J-C., Escudié, R., Hamelin, J., Steyer, J-P., Bernet, N., Delgenes, J-P., Dumas, C., Is substrate milling an adequate pretreatment for solid-state anaerobic digestion?. *Bioresour. Technol.* (Soumission en octobre 2013).

Motte, J-C., Escudié, R., Hamelin, Bonnafous, A., J., Steyer, J-P., Bernet, N., Delgenes, J-P., Dumas, C., Localization of microbial population during lignocellulosic residue solid-state anaerobic degradation (en preparation)

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

Motte, J-C., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C., Impact of high solid content, particles size and low inoculation on the solid state anaerobic digestion of wheat straw. *13th world congress on anaerobic digestion,* Santiago de Compostela, 25-28 June 2013.

Motte, J-C., Trably, E., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C., Impact of water content on biohydrogen production from lignocellulosic residues. *4th International symposium on energy from biomass and waste,* Venice, 12-15 November 2012.

Motte, J-C., Trably, E., Hamelin, J., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J-P., Steyer, J-P., Dumas, C., Impact of High Solid Content on Mesophilic and Thermophilic BioHydrogen Production from Lignocellulosic Residues. *BIOH$_2$,* Montreal, 5-7 August 2013.

BREVET

Escudié, R., Dumas, C., Guizzard, G., Loisel, D., **Motte, J-C.**, "Système de prélèvements d'échantillons solides en atmosphère contrôlée" Demande de brevet FR13 504493 déposée par l'INRA le 17/05/2013

1 INTRODUCTION

Les activités domestiques, industrielles ou agricoles génèrent un grand nombre de résidus solides. Pour diminuer leur impact sur l'environnement, le traitement et la valorisation de ces déchets apparaissent comme une nécessité. Les filières de traitement dépendent fortement de la nature et l'origine du résidu considéré et peuvent donc s'orienter soit vers un stockage contrôlé, soit vers une valorisation en tant que matière ou sous forme d'énergie… Parmi ces voies de valorisation, la méthanisation permet la transformation de la matière organique en un biogaz énergétique, composé de méthane et de dioxyde de carbone, par l'intermédiaire d'un écosystème microbien complexe. Ce procédé est notamment adapté aux résidus d'élevages (fumiers) ou agricoles (résidus de culture) qui sont produits en abondance sur le territoire et qui présentent des potentiels énergétiques importants. Toutefois, la méthanisation des résidus agricoles solides est limitée par une composition de type lignocellulosique. Cette matrice est principalement composée de deux familles de polymères biodégradables, la cellulose et les hémicelluloses, dont l'accessibilité est limitée par leurs imbrications avec une autre famille de polymères, très difficilement dégradables, les lignines.

La méthanisation des résidus lignocellulosiques requiert un ajout d'eau pour assurer la réaction. Son abondance conditionne deux variantes principales du procédé : la digestion humide pour une teneur en matières sèches (MS) inférieure à 15% et la digestion sèche pour une teneur en MS supérieure à 15%. Rapportée à une même charge organique, la digestion sèche présente des avantages économiques et pratiques du fait des teneurs en eau réduites : réduction du volume des digesteurs, réduction des consommations énergétiques et réduction des post-traitements des digestats. Cependant, ces procédés sont moins maitrisés que la méthanisation humide, notamment en raison des hétérogénéités importantes du milieu, des problématiques de transferts de matière et des fortes concentrations en composés inhibiteurs. Néanmoins, les méthaniseurs par voie sèche se sont développés à l'échelle industrielle, principalement à partir de connaissances issues de la digestion humide. Le procédé est donc globalement peu optimisé et présente des rendements spécifiques faibles ainsi que des temps de dégradation importants. Ce manque global de connaissances provient des nombreuses difficultés rencontrées dans l'étude des milieux secs. En effet, les fortes concentrations, les hétérogénéités ou encore la rhéologie des milieux, font interagir beaucoup de facteurs et réduisent la qualité des observations.

En raison des limitations de biodégradabilité induites par la structure complexe de la lignocellulose, la relation entre la biomasse microbienne et le substrat est au cœur de la réaction. Par conséquent, pour optimiser la méthanisation sèche dans son ensemble, il est nécessaire de comprendre finement le fonctionnement de la biodégradation du substrat. Puisque les conditions environnementales et la nature du substrat évoluent au cours de la biodégradation, l'implantation et la structuration de la biomasse microbienne doivent être favorisées dans l'objectif de dégrader efficacement le substrat lignocellulosique. L'ajustement des paramètres de procédé doit se faire en regard des performances globales, puisque leurs impacts sur les conditions environnementales locales de la digestion sèche

sont méconnus. Cependant, ces paramètres (teneur en eau, taux d'inoculation, prétraitements du substrat, température…) permettent d'agir de manière indirecte sur la relation entre les micro-organismes et le substrat. Il est donc nécessaire de prendre en compte de façon dynamique leurs effets sur les processus de biodégradation du substrat pour pouvoir optimiser le procédé dans son ensemble.

Il est ainsi difficile d'ajuster un paramètre sans agir simultanément sur plusieurs phénomènes au sein du milieu. Pour s'affranchir de cette limite, les stratégies d'étude sont donc souvent orientées vers une simplification du système. Il est néanmoins nécessaire de trouver un optimum entre :

- une simplification trop extrême ne permettant pas de transposer les informations sur des digesteurs plus proches de la réalité industrielle.
- le maintien d'une complexité importante ne permettant pas d'extraire d'informations précises et significatives.

L'objectif de cette thèse est donc d'apporter une compréhension précise de la dynamique de biodégradation des substrats lignocellulosiques en digestion sèche. Cette étude relie l'échelle macroscopique (paramètres et performances de procédé) à l'échelle microscopique (dégradabilité des structures microscopiques du substrat, structuration des micro-organismes, conditions environnementales locales). Cette évaluation à plusieurs échelles permet de comprendre les limitations biologiques de la biodégradation des substrats lignocellulosiques et de mettre en évidence les paramètres de procédé clés pour optimiser la réaction. Ces connaissances sur l'évolution de l'interaction entre les micro-organismes et le substrat au cours de la dynamique réactionnelle permettront une meilleure gestion des méthaniseurs par voie sèche.

La structure de la thèse est conditionnée par les stratégies mises en œuvre pour répondre aux objectifs de l'étude. Ce manuscrit se compose donc d'une introduction, d'une synthèse bibliographique permettant de positionner les objectifs de la thèse dans leur contexte scientifique, de la présentation du matériel et méthodes, des résultats et discussions, puis d'une conclusion générale. La stratégie retenue a consisté à suivre la dégradation de la paille de blé, modèle des résidus agricoles méthanisables, en réacteurs discontinus. L'utilisation d'une faible inoculation a permis de ralentir considérablement la vitesse de la réaction biologique pour mieux l'étudier ainsi que de favoriser la croissance des micro-organismes les plus adaptés aux conditions expérimentales. Quatre séries d'expériences ont été mises en place pour :

- comprendre comment les paramètres de procédés impactent les réactions de la digestion sèche.
- étudier le comportement métabolique des micro-organismes fermentaires en conditions de faibles teneurs en eau.

- déterminer comment les communautés microbiennes se spécialisent en fonction de l'avancement de la dégradation du substrat.
- valider les résultats par un taux d'inoculation moins contraignant tout en étudiant un mode de prétraitement du substrat.

Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'articles scientifiques. Chaque chapitre est donc composé d'un ou deux articles en anglais dont le texte et les figures respectent le format de leur soumission. Pour faciliter la lecture, chaque chapitre est introduit d'un avant-propos, puis approfondi par une discussion en français.

Ces recherches ont été réalisées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne. La thèse s'intègre principalement au sein de l'équipe de recherche BIO²CO (biodisponibilité, biodégradabilité et co-traitements), avec toutefois des échanges importants avec les équipes EMB (écologie microbienne et biodiversité) et BMR (biofilms mixtes en réacteurs). Le financement de cette thèse est quant à lui assuré par un contrat doctoral de l'université de Montpellier II (Ecole doctorale SPSA).

2 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 CONTEXTE DE L'ÉTUDE

2.1.1 DIGESTION ANAÉROBIE DES RÉSIDUS LIGNOCELLULOSIQUES

Dans un contexte de réduction des émissions de gaz à effet de serre (Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie, 2011), de valorisation des déchets (Buffière, Bayard & Germain, 2009), d'appauvrissement de la qualité agronomique des sols (Odlare, Pell & Svensson, 2008) et du besoin de production d'énergie renouvelable (EEA, 2013), la méthanisation, ou digestion anaérobie, est une technologie suscitant de plus en plus d'intérêt. Ce procédé permet la dégradation des résidus liés à l'activité humaine (déchets urbains, agricoles et d'élevage) pour produire un biogaz (composé principalement de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2)), contenant ainsi un fort potentiel énergétique (Buffière *et al.*, 2009). Le biogaz peut notamment être utilisé en cogénération pour produire de l'électricité et de la chaleur, être injecté dans le réseau de gaz de ville (Buffière *et al.*, 2009), ou employé comme carburant (Ademe, 2008). Outre la production d'énergie via le méthane, la digestion anaérobie peut également permettre de synthétiser d'autres molécules. En effet, le processus de digestion anaérobie conduit à la dégradation des matières organiques en plusieurs étapes réactionnelles produisant des molécules d'intérêts : de l'hydrogène, des acides gras volatils, des alcools ou des acides organiques (Clarke & Alibardi, 2010). Ces molécules ont un fort potentiel comme précurseur de la chimie verte (acides gras volatils et acides lactiques) ou pour la production de biocarburants (bioéthanol ou biohydrogène) (Clark, Deswarte & Farmer, 2009; Kaparaju *et al.*, 2009). Enfin, la méthanisation produit un résidu solide, le digestat. Le volume de matières sèches du digestat est inférieur au volume de matières entrantes. De plus, celui-ci concentre les éléments fertilisants du déchet méthanisé (azote et phosphore notamment) (Ademe, 2008). Dans le cas d'une bonne conformité avec les normes environnementales en vigueur, le digestat peut être utilisé dans l'agriculture, souvent après compostage (Moletta & Cansell, 2003).

La méthanisation des déchets agricoles (résidus de cultures et effluents d'élevage) offre la possibilité de produire un digestat compatible pour l'amendement notamment en raison de teneurs modérées en polluants organiques traces et en métaux lourd (Alexandre *et al.*, 2012). Les effluents d'élevage (lisiers) contiennent généralement une forte proportion d'éléments fertilisants et de matières organiques dont l'apport favorise la croissance des plantes (Abubaker, Risberg & Pell, 2012). Les résidus agricoles comprennent les fractions non comestibles des plantes cultivés pour l'alimentation. Dans certains cas, tels que celui des cultures énergétiques, l'ensemble de la plante peut être employée. Les plantes principalement concernées par la méthanisation agricole sont des angiospermes (plante à fleur) dont les pailles, tiges ou rafles ne sont pas valorisées: blé, riz, maïs, sorgho, orge et tournesol (Alexandre *et al.*, 2012). En particulier, les céréales produisent des pailles composées des tiges et des feuilles des plantes qui sont composées essentiellement de

lignocellulose. Selon le contexte territorial et l'exploitation agricole, ces pailles peuvent être enfouies (≈ 42% des pailles produites), utilisées pour l'élevage (≈ 54% des pailles produites, fourrage ou litières), incinérées pour une valorisation énergétique (≈ 3% des pailles produites) ou employées comme matière de base pour l'industrie (< 1% des pailles produites, papeterie, bâtiment, biotechnologies) (Requillart, 1984; Ademe, 1998; Gagnaire, Gabrielle & Silveira, 2006). Même si la paille représente environ 80% de la masse de la plante (Zeitun, 2011), la majorité des ressources financières des cultures de céréales provient de la fraction comestible des plantes : les graines (Sun, 2010). Ainsi, les ressources dédiées à la croissance du blé (énergies, matières organiques et engrais) conduisent à la production de résidus de culture peu valorisés ou recyclés (Figure 2-1).

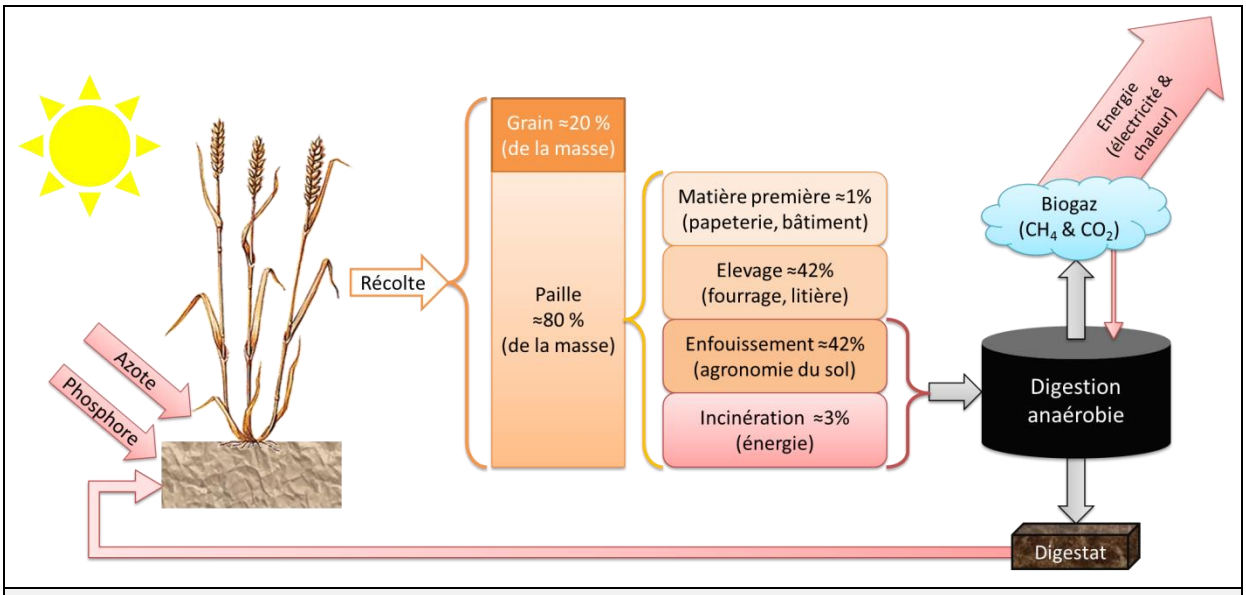


Figure 2-1 : Cycle du blé dans une problématique de retour au sol.
(Requillart, 1984; Ademe, 1998; Gagnaire *et al.*, 2006)

Plusieurs voies de réutilisation des pailles sont donc proposées : enfouissement, élevage et incinération. Parmi ces filières, l'enfouissement permet de conserver les qualités agronomiques des sols (éléments fertilisants, matières organiques et aération) mais n'exploite pas le potentiel énergétique des pailles et, durant la dégradation dans le sol, une part importante du carbone est émis dans l'atmosphère sous forme de CO_2. La valorisation énergétique, par incinération, conduit à la destruction de toute la matière organique et les éléments fertilisants contenus dans les pailles. Cette filière émet une quantité importante de gaz à effet de serres tout en contribuant à l'appauvrissement des sols puisqu'il n'y a pas de retour aux sols après prélèvement. Pourtant, la quantité de paille mobilisable pour une valorisation énergétique, sans danger pour l'agronomie, semble être d'environ 16% (soit 4 millions de tonne en France) (Gagnaire *et al.*, 2006). Les pailles actuellement incinérées ou enfouies pourraient donc être détournées vers des filières de méthanisation sans impact agronomique à la condition de retourner les digestats vers les sols (Figure 2-1), puisque ces digestats sont une bonne alternative aux fertilisants traditionnels (Abubaker *et al.*, 2012). Cette méthanisation des pailles, seules ou en codigestion (digestion anaérobie d'un mélange

de déchets), peut donc augmenter la valorisation économique (énergétique) des résidus agricoles tout en participant au maintien de la qualité agronomique des sols.

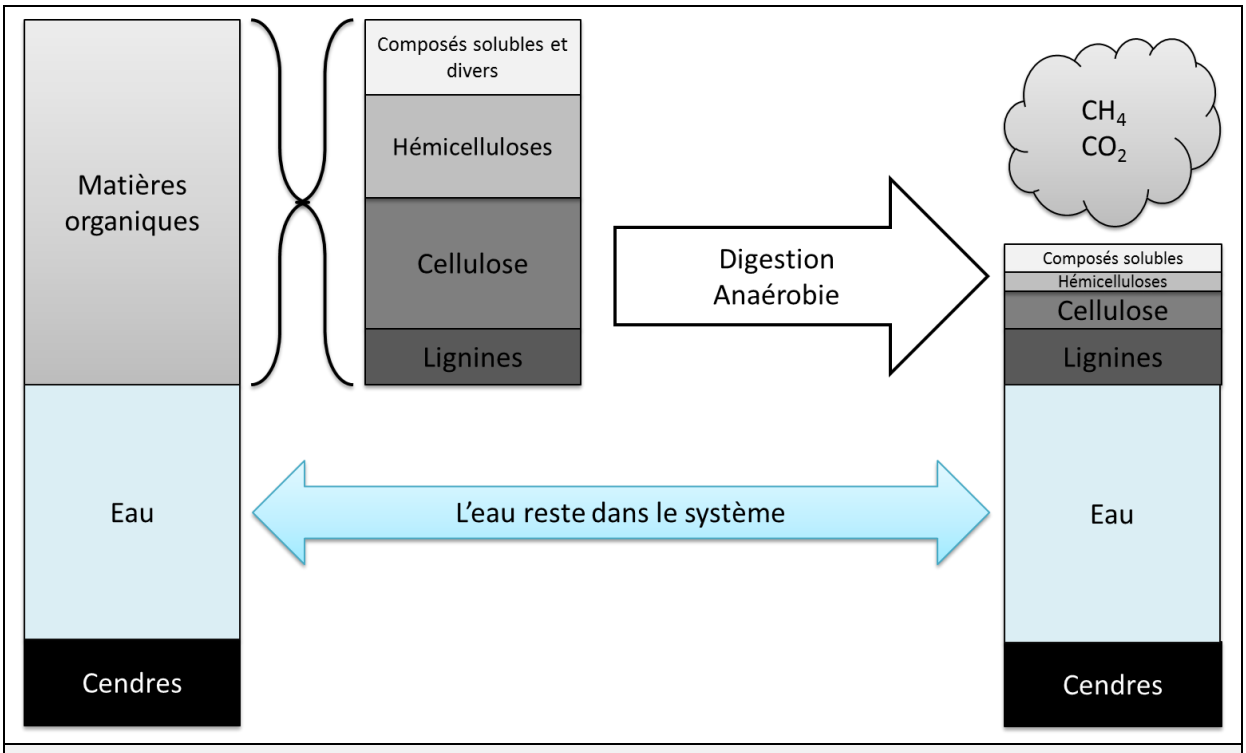


Figure 2-2 : Transformation et conservation des matières des résidus lignocellulosiques au cours de la digestion anaérobie.
Adapté de (Buffière & Frederic, 2008).

La méthanisation des déchets agricoles et en particulier des résidus lignocellulosiques est en plein développement. Néanmoins, cette filière est limitée par plusieurs facteurs économiques ou technologiques: la faible densité apparente de la biomasse restreint son transport (Clark *et al.*, 2009), la nature complexe des substrats lignocellulosiques limite les rendements de biogaz (Monlau *et al.*, 2013), les déséquilibres dans la composition biochimique imposent le recours à la codigestion (Ward *et al.*, 2008). De plus, les technologies de méthanisation ne sont pas spécifiquement optimisées pour le traitement des résidus lignocellulosiques. Les résidus agricoles sont des déchets solides à faible taux d'humidité, et par conséquent, leur traitement nécessite l'ajout d'une grande quantité d'eau pour atteindre les teneurs en eau habituelles de fonctionnement de la digestion anaérobie (Buffière *et al.*, 2009). Or, l'ajout d'eau est problématique d'un point de vue économique, puisqu'elle est conservée dans le système (Figure 2-2) (Buffière & Frederic, 2008) et doit être extraite avant valorisation/stockage du digestat. La teneur en matières sèches (MS) du milieu réactionnel conditionne deux catégories de procédés de digestion anaérobie: la méthanisation par voie humide (< 15% MS) et la méthanisation par voie sèche (> 20% MS) (De Baere, 2000; Vandevivere, Baere & Verstraete, 2002). En voie sèche, l'ajout d'eau est minimisé et ce mode de fonctionnement est donc plus adapté au traitement des déchets solides, tels que les résidus lignocellulosiques. La réduction de la teneur en eau peut induire de nombreux avantages économiques et pratiques tels que la diminution du volume du

digesteur pour une même charge organique appliquée, la réduction des consommations énergétiques pour le chauffage des digesteurs, l'absence fréquente de parties mobiles pour l'agitation et la réduction des post-traitements des digestats (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Cependant les fortes concentrations en matières sèches induisent des difficultés de pilotage du procédé principalement dues à la mauvaise homogénéisation du milieu, au comportement physique complexe des milieux de digestion et aux fortes concentrations en composés inhibiteurs (Vandevivere *et al.*, 2002). Ces avantages et inconvénients sont détaillés dans le Tableau 2-1.

	Avantages	Inconvénients
Technologies actuelles	✓ Absence de parties mobiles ✓ Procédé robuste ✓ Deux phases (solide et gaz) ✓ Peu de sédimentation	✓ Inadaptés aux liquides ✓ Faible automatisation ✓ Manipulation manuelle ✓ Moins de prétraitements applicables
Réaction biologique	✓ Forte charge ✓ Meilleur stabilité des digestats	✓ Faible contact substrat/micro-organismes ✓ Concentration des composés inhibiteurs ✓ Cinétiques lentes
Economique et environnemental	✓ Moins de prétraitements ✓ Faible consommation d'eau ✓ Chauffage réduit ✓ Faible volume de digesteur	✓ Equipements robustes nécessaires ✓ Main d'œuvre importante

Tableau 2-1 : Intérêts des procédés voie sèche vis à vis de la voie humide.
Cette comparaison tient compte d'une quantité identique de substrat. (Rapport *et al.*, 2008; Karthikeyan & Visvanathan, 2012)

2.1.2 MÉTHANISATION PAR VOIE SÈCHE INDUSTRIELLE

Les technologies de digestion anaérobie par voie sèche sont nombreuses et révèlent un manque de connaissances fondamentales (Vandevivere *et al.*, 2002; FAL, 2007; Rapport *et al.*, 2008; De Baere & Mattheeuws, 2010). Aucune configuration ou technologie générale ne semble émerger en particulier. Néanmoins, les procédés par voie sèche sont dominés par les technologies à une étape, tandis que la configuration (mode continu ou discontinu) et le mode de mélange semblent être les paramètres les plus technologiquement discriminants.

2.1.2.1 Configurations des procédés

2.1.2.1.1 Procédés discontinus

Les procédés de méthanisation discontinus (aussi appelés « batch ») se sont historiquement développés sur les connaissances issues des centres de stockage et

d'enfouissement d'ordures ménagères (Buffière *et al.*, 2009). Dans ces procédés, la matière est introduite dans une enceinte hermétique où se déroule la biodégradation. Ce mode de fonctionnement ne permet pas un contrôle fin de la réaction biologique. Une recirculation des jus de percolation est souvent employée pour contrôler la réaction biologique (température, inoculation, humidification du substrat). Par contre, les procédés discontinus sont caractérisés par une gestion simple de la réaction biologique et une faible maintenance des installations (Kusch, Schäfer & Kranert, 2011). Par conséquent, les coûts d'investissements sont souvent inférieurs d'environ 40% par rapport aux procédés continus (Vandevivere *et al.*, 2002). Plusieurs technologies de digesteurs batch ont ainsi été développées pour la méthanisation sèche : Biocel®, SEBAC®, APS®, Bioconverter®, Bioferm®, Eribox®…

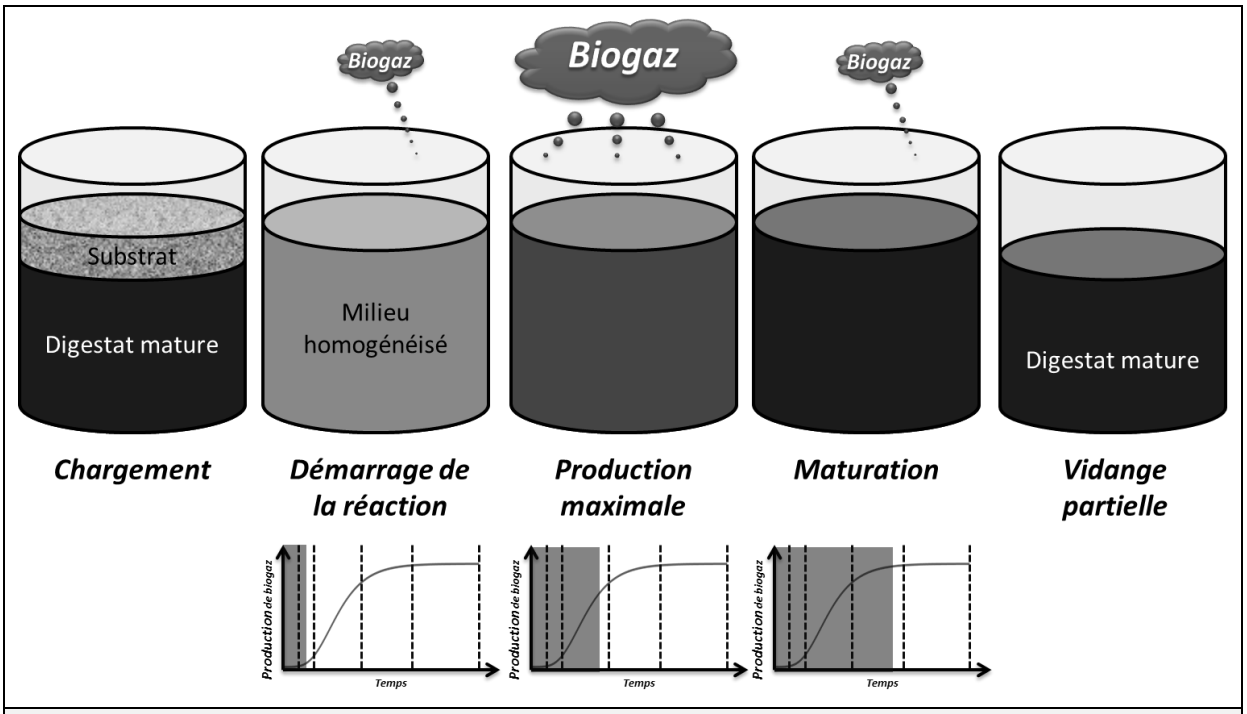


Figure 2-3 : Fonctionnement séquentiel des réacteurs discontinus en méthanisation sèche.

Le fonctionnement discontinu est donc le mode privilégié pour les digesteurs nécessitant un investissement réduit, une faible instrumentation et un faible niveau de formation des opérateurs. En contrepartie, la production de biogaz n'est pas constante, puisqu'elle suit la dégradation du substrat dans le digesteur. Pour maintenir relativement constante la production de biogaz, plusieurs réacteurs fonctionnant séquentiellement sont généralement mis en œuvre (Figure 2-3). Les digesteurs sont ainsi chargés à l'échelle d'une semaine puis scellés pendant plusieurs semaines, durant lesquelles un ou d'autres réacteurs sont alimentés (FAL, 2007). La limite principale des digesteurs discontinus réside dans les cycles de chargement/déchargement qui sont réalisés manuellement. Ces opérations nécessitent le recours d'engins agricoles et l'ouverture régulière des digesteurs, responsables de nuisances olfactives et sonores (Rapport *et al.*, 2008). Ces procédés sont

donc privilégiés dans le milieu agricole ou dans les zones de faible densité industrielle ou urbaine (FAL, 2007).

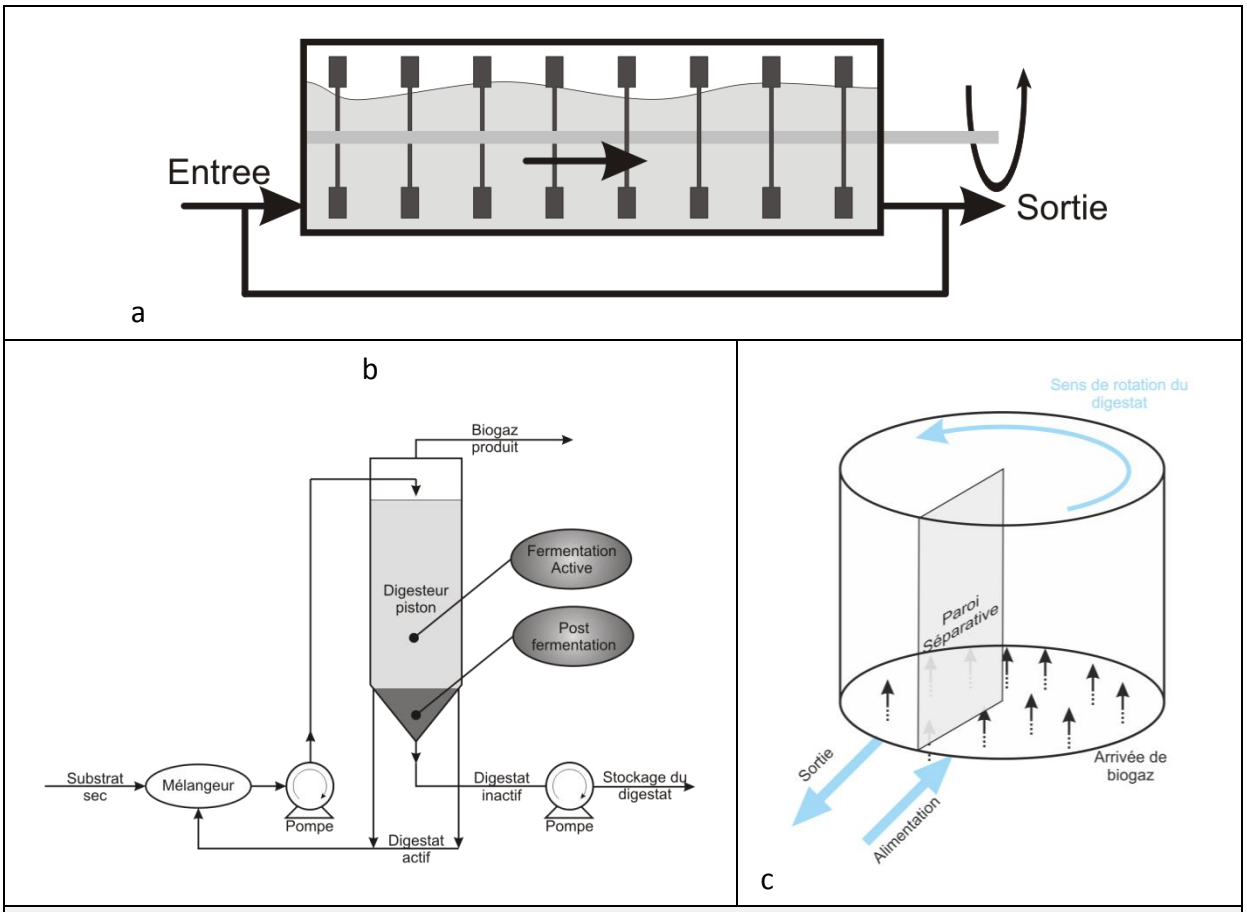


Figure 2-4 : Trois principales technologies de digesteurs continus.
(a) Digesteurs Kompogas® assurant la progression du digestat par un malaxeur. (b) Technologie Dranco® faisant progresser le digestat par gravité. (c) Technologie Valorga® utilisant des injections de biogaz et le cycle alimentation/soutirage pour l'agitation.

2.1.2.1.2 Procédés continus

Contrairement aux procédés discontinus, les procédés continus reposent sur une volonté d'automatisation des installations et d'optimisation des performances. Ils sont caractérisés par une production régulière de biogaz au cours du temps. Ce mode de fonctionnement est donc particulièrement adapté aux grosses unités et a été historiquement développé pour le traitement des ordures ménagères (Rapport *et al.*, 2008). De par leur fonctionnement et leur développement, ces installations reposent sur le savoir-faire issu des digesteurs anaérobies liquides en mode continu. Les cycles d'alimentation/soutirage ne sont pas réalisés en continu. Ils se produisent à intervalle régulier (une ou plusieurs fois par jours) et le nombre et la fréquence d'alimentation détermine le temps de séjour au sien du digesteur. Cette conduite particulière rapproche donc ces méthaniseurs d'un fonctionnement continu au sens strict (Vandevivere *et al.*, 2002). Le point commun entre toutes les technologies réside dans une configuration

théorique de type piston. Par définition, la configuration piston induit un faible mélange au sein du digesteur durant la progression du digestat.

D'un point de vue technologique, les procédés continus sont dominés par trois procédés industriels : Kompogas®, Dranco® et Valorga® (Figure 2-4) (Li & Liew, 2011). Ces trois technologies aux concepts différents traduisent la complexité d'exploitation des digesteurs. Le procédé Kompogas® est un réacteur horizontal principalement conduit en conditions thermophiles (Rapport *et al.*, 2008). Le milieu progresse dans le digesteur par l'action combinée d'un malaxeur et de l'alimentation en substrat. Cette technologie est retenue sur de nombreux sites en Europe principalement pour son automatisation et ses performances (10 à 15 jours de temps de séjour), malgré un investissement et des coûts d'entretiens très élevés (FAL, 2007). Le procédé Dranco® (OWS) utilise la gravité et une forte recirculation des digestats et percolâts pour faire progresser le milieu dans le réacteur. Ce procédé emploie un réacteur cylindrique orienté verticalement. L'alimentation est réalisée par le haut du digesteur (Rapport *et al.*, 2008). Ce réacteur est souvent conduit en conditions thermophiles. Malgré l'absence de parties mobiles, le procédé Dranco® requiert de forts investissements et induit des coûts d'entretien élevés. Le procédé Valorga® est un procédé ayant la particularité d'une mise en circulation du milieu par injection de biogaz dans l'enceinte cylindrique du digesteur et autour d'une paroi fixe. L'action combinée de l'alimentation et de la réinjection de biogaz induit une agitation verticale et une circulation horizontale du milieu réactionnel. Cette technologie fonctionne en conditions mésophiles et thermophiles (Moletta, 2008). La difficulté de cette technologie réside dans le risques de colmatage des buses de recirculation du biogaz (Vandevivere *et al.*, 2002).

2.1.2.1.3 Procédés à deux étapes

D'autres configurations reposent sur le constat que l'hydrolyse de la matière est généralement l'étape limitante dans la digestion anaérobie des résidus solides (Buffière *et al.*, 2006). Ainsi, séparer l'hydrolyse de la méthanogenèse en deux réacteurs distincts (Figure 2-5) permet théoriquement d'améliorer les cinétiques de dégradation puisque chaque étape est ainsi optimisée individuellement (Lehtomäki *et al.*, 2008). Même si le nombre de réalisations industrielles est globalement plus faible que les procédés mono-étapes, ce mode de fonctionnement a permis l'émergence de quelques technologies : Biopercolat® et Linde-KCA® (Rapport *et al.*, 2008). Ces technologies sont cependant principalement utilisées avec des teneurs en matières sèches intermédiaires entre la digestion humide et sèche (15 à 20% MS).

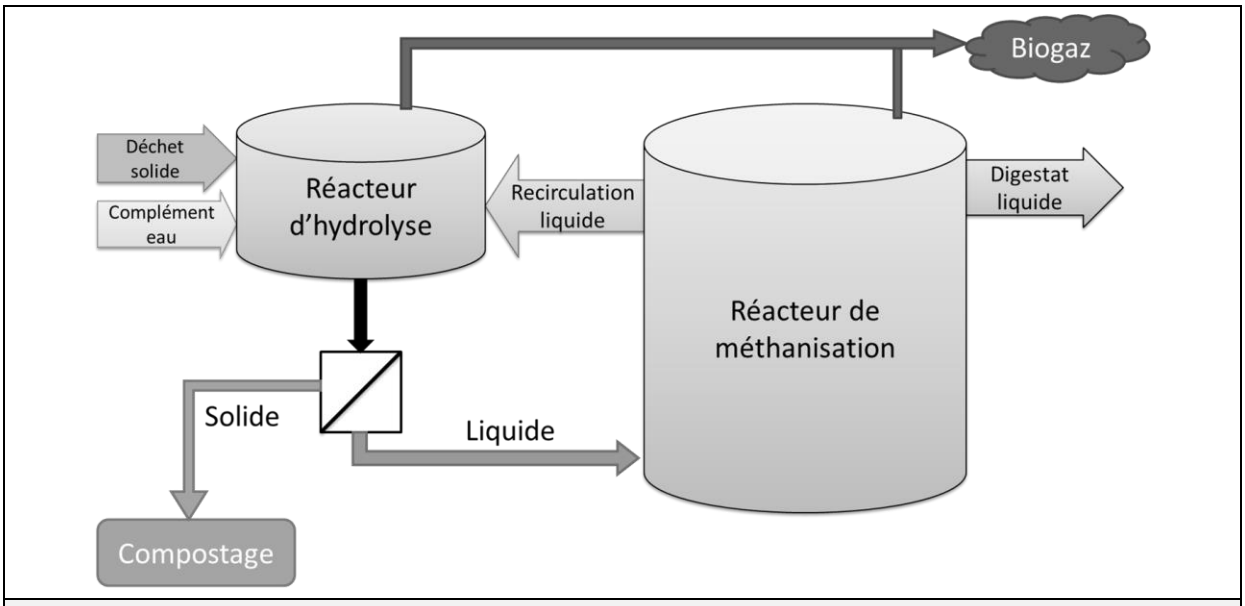


Figure 2-5 : Concept général des digesteurs à deux étapes.
(Rapport *et al.*, 2008)

Dans ces technologies, les étapes de pré-hydrolyse sont réalisées en conditions aérobies et voie sèche, tandis que la méthanogenèse (anaérobie) est réalisée en voie semi-sèche. Cet usage de la voie aérobie pour l'hydrolyse des substrats est théoriquement remplaçable par une étape de fermentation produisant de l'hydrogène (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a). Le mélange hydrogène/méthane ainsi produit constitue un biogaz présentant une meilleure combustion que le biogaz traditionnel : le biohythane (Liu *et al.*, 2013). Bien que prometteur, ce concept est principalement étudié en condition humide et n'est pas encore appliqué à l'échelle industrielle. Le développement d'applications en voie sèche comprenant une première étape de fermentation anaérobie est actuellement réservée aux études de laboratoires (Andersson, 2002; Kvesitadze *et al.*, 2011).

2.1.2.2 Paramètres de procédés en voie sèche

2.1.2.2.1 Inoculation

L'inoculation permet de mettre en contact les micro-organismes avec le substrat (Buffière *et al.*, 2009). Cette mise en contact est particulièrement importante en digestion sèche en raison des faibles teneurs en eau limitant la propagation des micro-organismes dans le milieu. Puisque la digestion sèche est conduite avec peu ou pas d'agitation, une mise en contact, la plus homogène possible, doit être réalisée. Cette étape consiste généralement en un mélange entre le substrat et une source de micro-organismes constituée par le digestat issu d'un batch précédent ou de la sortie du digesteur continu ou uniquement la fraction liquide du digestat (percolâts, jus…). Cette préparation peut inclure des prétraitements mécaniques pour homogénéiser l'ensemble. Le mélange est assuré soit par un mélangeur dédié (automatique), soit par des engins agricoles. Pour assurer une bonne opération des digesteurs, des inoculations très importantes sont généralement réalisées.

Des ratios de 10 à 20% (Ordure ménagère / digestat mature, exprimé en matière brut) sont ainsi fréquemment relevés à l'échelle industrielle (Rapport *et al.*, 2008; Kusch *et al.*, 2011). Ces inoculations massives permettent non seulement de maximiser le contact initial entre les micro-organismes et le substrat, mais aussi d'éviter les risques d'accumulation en acides organiques conduisant à l'acidification des digesteurs. En contrepartie, de telles charges en micro-organismes réduisent considérablement le volume utile des digesteurs.

2.1.2.2.2 Agitation des digestats

L'agitation induit plusieurs effets simultanés sur la digestion sèche : progression du milieu au sein du digesteur, dispersion des produits de fermentation (gaz ou liquide), mise en contact du substrat et des micro-organismes. En continu, la progression du substrat dans les digesteurs, au fur et à mesure de la dégradation du substrat, est une contrainte associée à la notion d'agitation. Cependant, l'agitation est coûteuse en énergie en raison des fortes contraintes mécaniques liées à la mise en mouvement de solides. Technologiquement, la manipulation de solides empêche le recourt à des systèmes de pompages qui sont prédominant en voie humide. La rhéologie des milieux secs est donc au cœur des problématiques d'agitation (Battistoni *et al.*, 1993; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Moins coûteuse, la recirculation des lixiviats (principalement en batch) permet d'assurer une mise en contact en cours de dégradation et une « homogénéisation » des massifs. Cependant, l'apparition fréquente de chemins préférentiels dans le milieu réduit la portée de cette solution. Cette méthode est tributaire d'une teneur en eau minimale permettant l'écoulement d'une phase liquide.

2.1.2.2.3 Teneur en eau

La teneur en matières sèches (MS) est l'un des paramètres les plus important puisqu'elle conditionne la rhéologie du milieu, la dilution de la phase liquide ou l'homogénéité de l'humidification du substrat (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Il n'y a pas de valeur commune de teneur en matières sèches pour les différentes technologies. Globalement, les technologies en voie sèche fonctionnent à des teneurs en matières sèches (siccités) supérieures à 20%. Cette limite inférieure est généralement choisie de sorte à éviter l'obtention d'un milieu diphasique (liquide-solide). Dans la majorité des cas, les installations industrielles fonctionnent à moins de 30% MS. Cette valeur est notamment choisie pour s'assurer de la présence d'un lixiviat et pour éviter les risques de disfonctionnement des réacteurs observés pour des hautes teneurs en MS. A l'extrême, la teneur en MS peut atteindre 40% pour les configurations les plus optimisées (Rapport *et al.*, 2008). Cependant, ces valeurs sont celles fixées en entrée des digesteurs, puisque la biodégradation des matières organiques conduit à une humidification du milieu (Brown, Shi & Li, 2012). Ceci peut donc conduire à des écarts entre la siccité de l'alimentation des digesteurs et celle du milieu réactionnel.

2.1.2.2.4 Température

Il est acquis que deux gammes de températures principales existent en digestion anaérobie : mésophile (35°C) et thermophile (55°C). Le gain de productivité obtenu par le passage en mode thermophile doit alors être suffisant pour permettre la rentabilité du procédé (De Baere & Mattheeuws, 2010). Ce gain provient généralement d'une vitesse de réaction accrue en raison d'une hydrolyse du substrat facilitée à haute température (Converti *et al.*, 1999). Atteindre des températures thermophiles nécessite un apport d'énergie pour le chauffage du réacteur souvent fourni par le détournement d'une fraction du biogaz produit. La diminution de la teneur en eau et du volume de réacteur réduit la consommation énergétique spécifique (ramenée au déchet frais) pour le chauffage du milieu (Cecchi *et al.*, 1991). Cet avantage permet de fixer les températures thermophiles tout en maintenant positif le gain énergétique (coût de chauffage vs. augmentation de la production de biogaz). En voie sèche, le chauffage est réalisé soit par chauffage de l'enceinte du digesteur (sol et/ou parois), soit par chauffage des entrées/recirculations. Cependant la réduction de la quantité d'eau induit des effets complexes lié à la température: hétérogénéités thermiques dans le milieu, biomasses microbiennes thermophiles sensibles aux conditions stressantes et hydrolyse du substrat plus importante à températures élevées (Cecchi *et al.*, 1991; Converti *et al.*, 1999; de la Rubia *et al.*, 2005).

2.1.2.2.5 Nature du substrat

La nature du substrat est un facteur déterminant dans la conception et l'exploitation des digesteurs. En effet, la biodégradabilité, les cinétiques ou le comportement rhéologique des substrats conditionnent le choix des technologies de méthanisation. La nature des substrats et leur quantité est tributaire du contexte territorial du digesteur (Ademe, 2008). Cependant, une modification de la structure des substrats par prétraitements est souvent envisageable. Pour être viables économiquement, ces prétraitements doivent fournir un gain de productivité ou de vitesse de réaction suffisant pour justifier une augmentation de la consommation énergétique par le prétraitement. A l'heure actuelle, seuls les broyages des substrats sont appliqués à l'échelle industrielle, principalement dans un souci d'homogénéisation et de densification des milieux. Par conséquent, les réductions granulométriques restent souvent limitées (centimètres).

2.1.3 DÉVELOPPEMENT DE LA VOIE SÈCHE

Les avantages théoriques et pratiques des procédés de digestion anaérobie par voie sèche ont conduit à un développement de ces procédés à l'échelle industrielle. Ce déploiement a suivi de près le développement de la digestion humide (De Baere & Mattheeuws, 2010). Pourtant, si la digestion sèche est une réalité industrielle depuis les années 1990 (De Baere, 2000), son développement a peu été suivi par des travaux de recherches fondamentales spécifiques contrairement aux recherches sur la voie humide (Figure 2-6). En recherchant parmi les titres des publications, la digestion sèche ne

représente que 9,4% des recherches liés à la digestion anaérobie depuis 1989 (861 contre 9169), et 11,1% durant ces cinq dernières années (439 contre 2942). Ainsi, la recherche fondamentale spécifique à la digestion sèche ne semble active que depuis les années 2007-2008. L'absence de consensus sur la dénomination des procédés voie sèche est révélatrice de leur récent essor. Ainsi, de nombreuses terminologies sont retrouvées dans la littérature internationale, parmi lesquelles: « dry anaerobic digestion », « high-solid anaerobic digestion » ou encore « solid-state anaerobic digestion » (Martin, 2001).

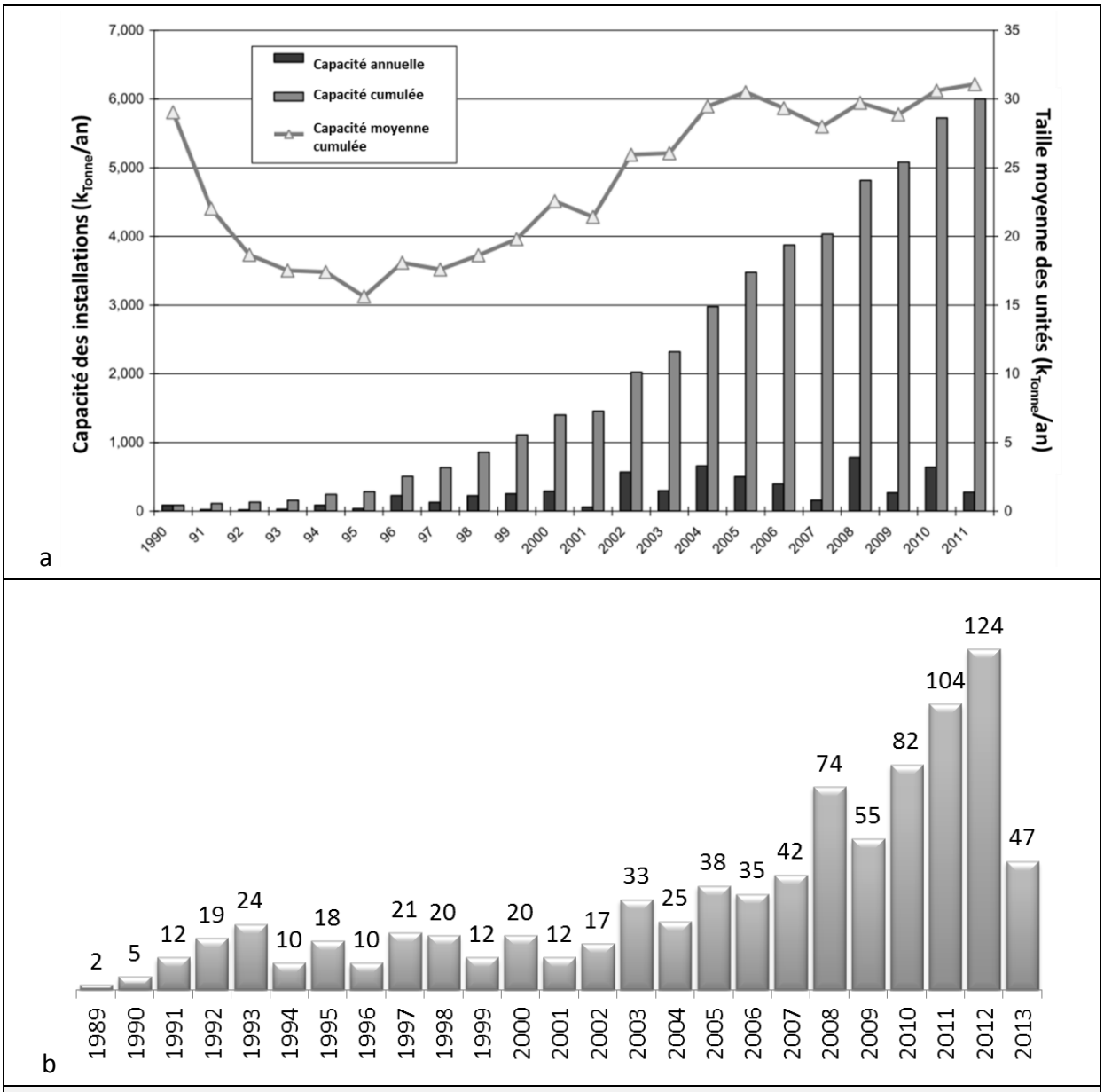


Figure 2-6 : Retard de la recherche fondamentale sur la digestion sèche.
(a) Développement des installations de méthanisation. (De Baere & Mattheeuws, 2010). (b) Evolution du nombre de travaux de recherche (Recherche sur Web of Science, Juillet 2013 : sujet comprenant « anaerobic digestion » et « dry » ou « solid state » ou high-solid* ».

Les technologies de méthanisation sèche ont donc été développées de manière empirique à partir des connaissances issues de la digestion humide (Jha *et al.*, 2011). Les nombreuses variantes technologiques développées au cours du temps (Vandevivere *et al.*, 2002; Karthikeyan & Visvanathan, 2012) témoignent d'objectifs et de contraintes diverses liés au digesteurs par voie sèche : optimisation du rendement énergétique ou épuratoire, type de substrat, amélioration de la fiabilité, réduction des investissements, simplicité opératoire... Ainsi, le pilotage ou le design des digesteurs secs dépendent des paramètres de procédés, des caractéristiques du substrat et du comportement de la biomasse microbienne. Les effets de ces paramètres sur la dégradation anaérobie sont actuellement peu maitrisés et peu étudiés. La forte complexité des milieux secs affecte le fonctionnement et les performances de la digestion anaérobie par de fortes interactions entre les paramètres du procédé (Forster-Carneiro, Pérez & Romero, 2008; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b). De plus, la digestion sèche est un système dynamique durant lequel la biomasse microbienne et les caractéristiques du substrat évoluent (Shi *et al.*, 2013). Cette évolution est dépendante des conditions environnementales, elles-mêmes dépendantes des paramètres de procédés. Par conséquent, une approche dynamique et globale est nécessaire pour l'étude de la méthanisation sèche. Cette complexité d'étude est sans doute la raison principale pour laquelle un manque de connaissances fondamentales existe.

2.2 ECOSYSTÈMES DE LA MÉTHANISATION

La digestion anaérobie fait intervenir un ensemble de réactions biologiques permettant la dégradation des matières organiques en molécules de plus en plus simples jusqu'à la production d'un biogaz composé essentiellement de méthane et de dioxyde de carbone. Ces transformations sont réalisées par un écosystème complexe impliquant plusieurs catégories de micro-organismes utilisant les produits de dégradation d'autres micro-organismes comme substrat. Quatre phases principales de dégradation sont classiquement décrites en digestion anaérobie (Moletta, 2008) : l'hydrolyse, l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse (Figure 2-7).

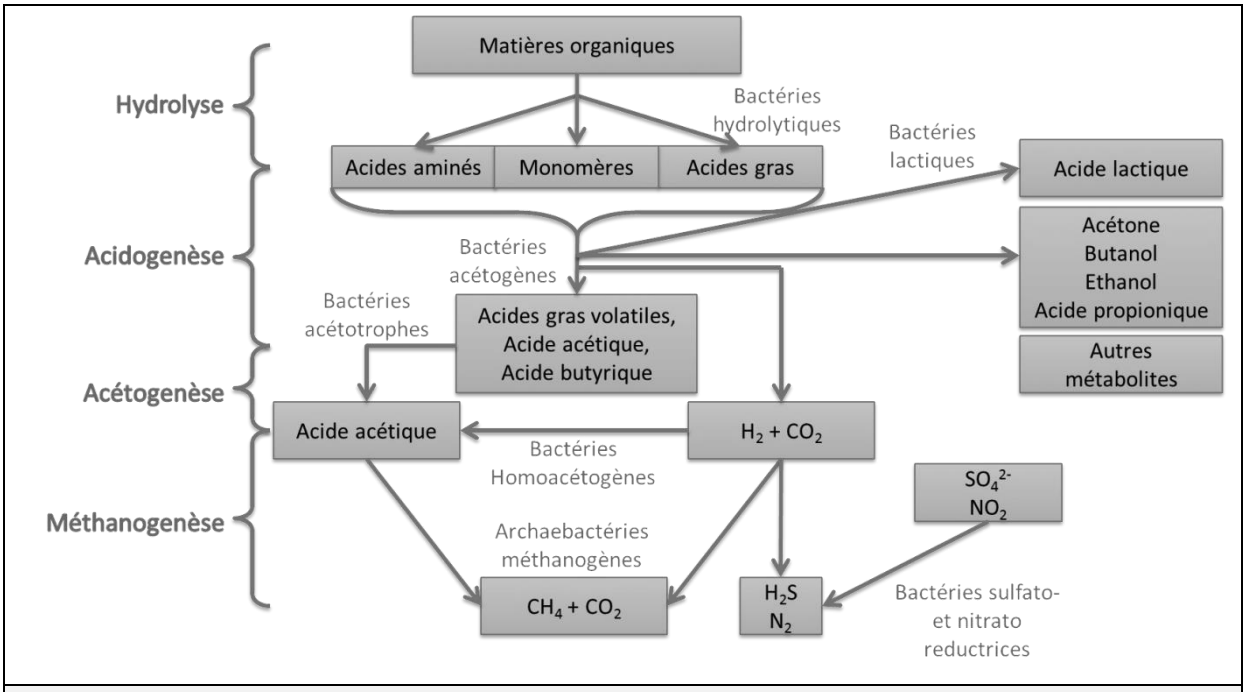


Figure 2-7 : Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie.

2.2.1 QUATRE PHASES DE DÉGRADATION

2.2.1.1 Hydrolyse

L'hydrolyse consiste à déstructurer un substrat constitué de matière organique complexe en molécules plus simples et facilement assimilables par les micro-organismes. Les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques ou les lipides peuvent être hydrolysés en monomères tels que des sucres, acides aminées, bases azotées ou acides gras. Cette dégradation est principalement assurée par des enzymes produites par des micro-organismes dits « hydrolytiques ». Malgré le taux de doublement rapide de ces populations microbiennes, l'hydrolyse est l'étape limitante dans la dégradation des matières organiques solides (Philippidis & Smith, 1995), notamment en raison des difficultés d'accès au substrat. Cette étape peut être favorisée par des prétraitements appropriées (Monlau *et al.*, 2013) ou

par des températures élevées favorisant l'activité des enzymes thermophiles lors d'une hydrolyse biologique (Pohl *et al.*, 2012).

De nombreux micro-organismes anaérobies stricts ou facultatifs sont impliqués dans l'hydrolyse. L'inventaire exhaustif est impossible en raison de la diversité des communauté microbiennes et des conditions environnementales de la digestion anaérobie (pH, température, teneur en eau, type de procédé…) (Moletta, 2008). Néanmoins, parmi les nombreux genres microbiens impliqués dans l'hydrolyse, il est possible de citer les genres : *Clostridium*, *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Cillobacterium*, *Bacillus*, *Lachnospira*, *Micrococcus*, *Mocrococcus*, *Pseudomonas*, *Succinomonas*, *Anaerovibrio*, *Syntrophomonas*, *Staphylococcus* ou *Peptococcus* en conditions mésophiles. En condition thermophile, une plus grande spécialisation des genres est observée : *Clostridium*, *Anaerocellum*, *Acetomicrobium*, *Thermoanaerobacter* ou *Coprothermobacter*.

2.2.1.2 Acidogenèse

L'acidogenèse, ou fermentation, est l'étape permettant de transformer les produits de l'hydrolyse en molécules facilement assimilables : acides gras volatils, alcools, acides organiques, hydrogène et dioxyde de carbone. Ces molécules peuvent présenter un fort pouvoir inhibiteur (en particulier l'hydrogène et les acides gras volatils) (Mata-Alvarez, Macé & Llabrés, 2000; Siegert & Banks, 2005). Or, les micro-organismes acidogènes ont un métabolisme rapide vis à vis des étapes ultérieures (acétogenèse et méthanogenèse). Par conséquent, l'ensemble du processus de méthanisation peut facilement être inhibé par une surcharge en composés organiques. Pour cette raison, l'acidogenèse est une étape clé de la méthanisation dont les produits de réaction doivent être dégradés ou extraits le plus rapidement possible.

Globalement, les micro-organismes acidogènes sont anaérobies stricts et ont un métabolisme et un rythme de croissance rapide (temps de doublement de quelques heures). Parmi les genres microbiens fréquemment retrouvés, il est possible de citer les genres: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* et la famille des *Enterobacteriaceae* (Moletta, 2008).

2.2.1.3 Acétogenèse

L'acétogenèse permet de simplifier les molécules issues de l'acidogenèse (acides gras volatils, éthanol, acides lactiques…) en dioxyde de carbone, hydrogène et acide acétique. Deux voies métaboliques sont impliquées : une voie hétérofermentaire et une voie homoacétogène. La voie hétérofermentaire produit de l'H_2 et du CO_2, tandis que la voie homoacétogène produit exclusivement de l'acide acétique par réaction de l'hydrogène et du dioxyde de carbone ou des acides organiques. L'acétogenèse est donc assurée par deux catégories de micro-organismes.

La première catégorie est composée de micro-organismes syntrophes qui produisent obligatoirement de l'hydrogène. Ce gaz ayant une action inhibitrice sur la croissance microbienne et les réactions biochimiques, ces micro-organismes se développent obligatoirement avec des micro-organismes consommateurs d'hydrogène. Ces espèces syntrophes ont une croissance plutôt lente (temps de doublement de 1 à 7,5 jours) et sont principalement composées des genres : *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Syntrophococcus* ou *Syntrophosphora*.

La seconde catégorie regroupe les micro-organismes homoacétogènes qui produisent de l'acide acétique soit par réduction du CO_2 par l'H_2, soit par la transformation du substrat carboné. Ces micro-organismes permettent notamment le maintien de concentrations non inhibitrices d'hydrogène dans le milieu. Ainsi, les genres *Butyribacterium* et *Peptococcus* sont impliqués dans la production d'acide acétique à partir de substrat, tandis que la production à partir d'hydrogène est assurée par les genres *Acetoanaerobacterium*, *Acetobacterium*, *Acetofilamentum*, *Acetohalobium*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Acetotitomaculum*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Sporomusa* ou *Thermoanaerobacter*.

2.2.1.4 Méthanogenèse

La méthanogenèse est l'étape ultime de la digestion anaérobie et consiste à transformer les produits de l'acétogenèse en méthane. Deux types de réactions sont impliqués dans cette étape et permettent la production de méthane. La première, la voie hydrogénotrophe, produit du méthane à partir de l'H_2 et du CO_2. La seconde, la voie acétoclaste, produit du méthane et du CO_2 principalement à partir de l'acide acétique.

Les micro-organismes de la méthanogenèse sont anaérobies stricts et appartiennent tous au domaine des *Archaea*. Leur taux de croissance est faible et similaire aux micro-organismes impliqués dans l'acidogenèse (temps de doublement de quelques heures à plusieurs jours). Les *Archaea* hydrogénophiles évoluent en association syntrophiques avec les espèces productrices d'hydrogène (acidogenèse), et sont dominés par les genres : *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* et *Methanocorspusculum*. Les *Archaea* acétoclastes sont de genre *Methanosarcina* et *Methanosaeta*.

2.2.1.5 Autres processus de la digestion anaérobie

D'autres réactions biologiques interviennent lors d'un processus de digestion anaérobie. Ces réactions consomment une fraction de l'hydrogène et diminuent donc les rendements énergétiques du procédé.

La sulfato-réduction qui utilise le sulfate comme accepteur final d'électrons consomme une part des acides gras volatils, des alcools ou de l'hydrogène et conduit à la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S). Ces transformations sont assurées par des bactéries sulfato-

réductrices. Ces micro-organismes entrent en compétition avec les *Archaea* méthanogènes. Les bactéries sulfato-réductrices sont du genre *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfobotulus*, *Desulfomonile*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* ou *Archaeglobus* (Moletta, 2008).

Les composés azotés peuvent également être transformés sous forme d'azote gazeux (N_2). La réaction repose sur deux réactions, la dénitrification (consommation d'hydrogène et de nitrate pour former du diazote) et l'oxydation anaérobie de l'ammonium (consommation de l'ammonium et de nitrate pour former du diazote). La dénitrification est accomplie par de nombreux micro-organismes anaérobies, tels que *Paracoccus denitrifican,* capables d'utiliser des composés soufrés ou l'hydrogène comme accepteur final d'électronss. L'oxydation anaérobie de l'ammonium est effectuée par une nombre réduit d'espèces appartenant généralement à l'embranchement des *Planctomycetes* et caractérisé par des taux de croissance faibles (Moletta, 2008).

Enfin, en marge de l'acidogenèse, d'autres réactions biologiques, proche des voies hétérofermentaires peuvent conduire à la formation d'acides organiques tels que les acides pyruviques, butyriques ou propioniques.

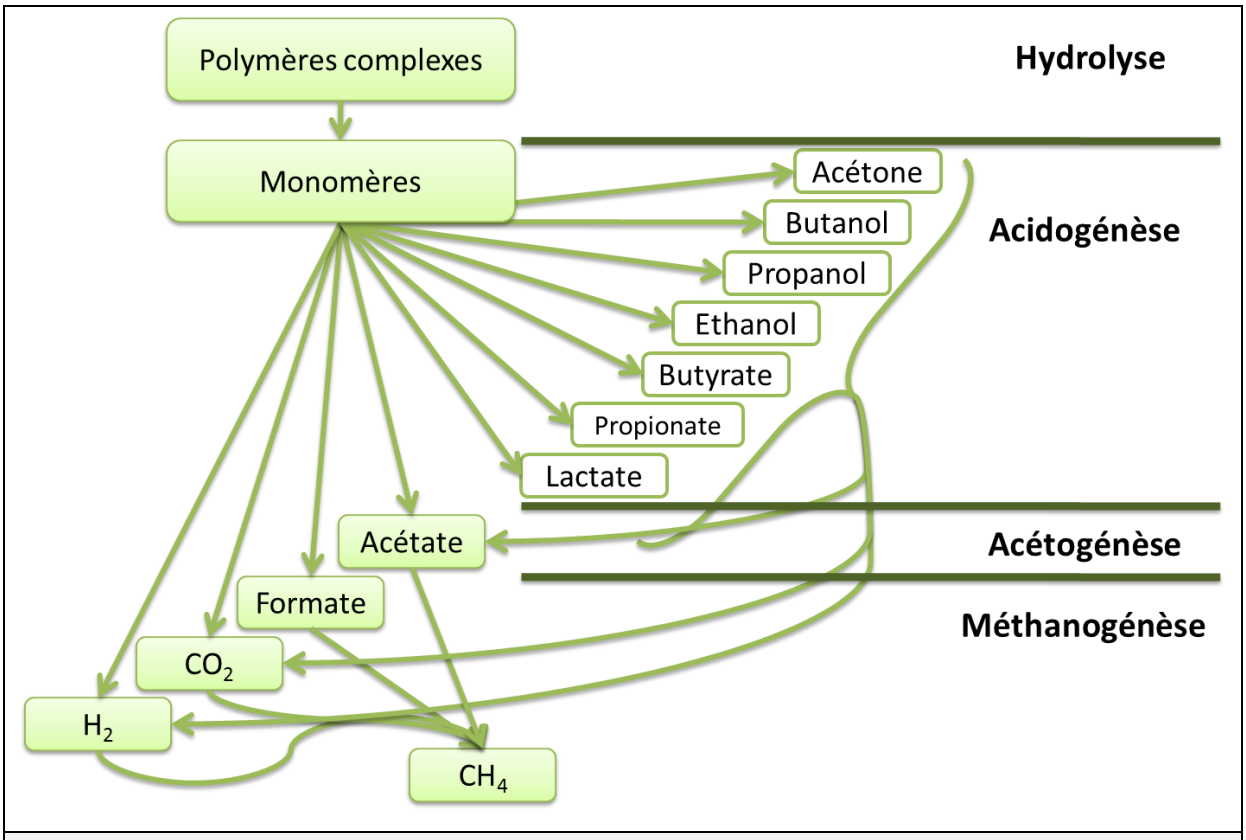


Figure 2-8 : Les flux métaboliques de la digestion anaérobie.
(Moletta, 2008)

2.2.2 MÉTABOLITES DE LA DIGESTION ANAÉROBIE

Chaque étape de la digestion anaérobie produit des métabolites qui sont substrats de réactions ultérieures (Figure 2-8). La production et l'utilisation de ces métabolites est donc à la fois un indicateur de l'état de l'écosystème mais aussi des réactions métaboliques mises en œuvre pour la dégradation (Aceves-Lara *et al.*, 2008). Ainsi, un profil métabolique lié à la production d'hydrogène concomitante à la production d'acide acétique et butyrique est favorable à la digestion anaérobie. Ceci s'explique par de fortes vitesses de biodégradation de ces métabolites en méthanisation (Aguilar, Casas & Lema, 1995; Vavilin & Lokshina, 1996), notamment en comparaison d'acides organiques dont la production est dissociées de la production d'hydrogène, tels que les acides lactique et propionique (Stadtman, Stadtman & Barker, 1949; Zhang, Cai & He, 2007a; Li *et al.*, 2012). De plus, les réactions associées à la production d'hydrogène sont généralement favorisées par les équilibres thermodynamiques ($\Delta G°' < 0$) (Latrille, Trably & Larroche, 2011; Li *et al.*, 2013). Pour cette raison, les principaux flux métaboliques de la méthanisation sont présentés selon leur production et leur consommation vis-à-vis de l'hydrogène. De plus, ces réactions sont « normalisées » en prenant le glucose comme substrat de référence, notamment parce que cette molécule est produite lors de l'hydrolyse des résidus lignocellulosiques (Monlau *et al.*, 2013).

2.2.2.1 Voies réactionnelles

2.2.2.1.1 Voies fermentaires associées à l'hydrogène

Les principales réactions fermentaires associées à la production d'hydrogène sont présentées dans la première partie du Tableau 2-2. Les deux principales réactions (équations 1 et 2) sont réalisées à partir du substrat carboné issu de l'hydrolyse et conduisent à la production d'acides acétique et butyrique (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Guo *et al.*, 2010). Selon ces deux réactions, chaque mole de ces deux acides formée est systématiquement associée à la production de deux moles d'hydrogène. Par conséquent, un bilan de matière sur l'hydrogène et les acides acétique et butyrique permet de mettre en évidence une éventuelle consommation d'hydrogène (Rafrafi *et al.*, 2013). De plus, le ratio molaire d'acides butyrique/acétique, généralement proche de 1,5 en culture fermentaire mixte (Guo *et al.*, 2010), permet de mettre en évidence une éventuelle activité homoacétogène. Ainsi, la distribution en métabolites est un indicateur des voies métaboliques exprimées par l'écosystème.

N°	Type	Substrats	Produits	ΔG°' (kJ.mol^{-1})
Voies productrices d'hydrogène				
1	Acidogenèse	$Glucose + 2H_2O$	$Butyrate + 2HCO_3^- + 2H_2 + 3H^+$	-264
2	Acidogenèse	$Glucose + 4H_2O$	$2Acétate + 2HCO_3^- + 4H_2 + 4H^+$	-215
3	Acétogenèse	$Lactate^- + 2H_2O$	$Acétate^- + 3HCO_3^- + H^+ + 2H_2$	-4
4	Acétogenèse	$Ethanol + 2H_2O$	$Acétate^- + 2H_2 + H^+$	+10
5	Acétogenèse	$Butyrate^- + 2H_2O$	$2Acétate^- + 2H_2 + 3H^+$	+48
6	Acétogenèse	$Propionate^- + 3H_2O$	$Acétate^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76
Voies consommatrices d'hydrogène				
7	Acidogenèse	$Glucose + H_2$	$2Propionate + 2H_2O$	-359
8	Méthanogenèse	$4H_2 + HCO_3^- + H^+$	$CH_4 + 3H_2O$	-136
9	Homoacétogenèse	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+$	$Acétate + 4H_2O$	-105
10	Sulfato-réduction	$4H_2 + SO_4^{2-} + 2H^+$	$H_2S + 4H_2O$	-152
11	Dénitrification	$2NO_3^- + 5H_2 + 2H^+$	$N_2 + 6H_2O$	Nd.
Voies dissociées de la production ou de la consommation d'hydrogène				
12	Acidogenèse	$Glucose$	$3Acétate + 3H^+$	-311
13	Acidogenèse	$Glucose + 2H_2O$	$2Ethanol + 2HCO_3^- + 2H^+$	-225
14	Acidogenèse	$Glucose$	$2Lactate + 2H^+$	-198
15	Acétogenèse	$3Lactate^-$	$2Propionate^- + Acétate^- + HCO_3^- + H^+$	-165
16	Sulfato-réduction	$Acétate + SO_4^{2-}$	$H_2S + 2HCO_3^-$	-48
17	Oxydation de l'ammoniaque	$NO_2^- + NH_4^+$	$N_2 + 2H_2O$	Nd.
18	Méthanogenèse	$Acétate^- + H_2O$	$CH_4 + HCO_3^-$	-31

Tableau 2-2 : Réactions métaboliques de la méthanisation.
Les énergies libres de Gibbs standards sont calculées à pH 7 et à 25°C.
D'après (Cord-Ruwisch, Seitz & Conrad, 1988; Moletta, 2008; Latrille *et al.*, 2011).

2.2.2.1.2 Voies consommatrices d'hydrogène

Les principales réactions impliquées dans la consommation d'hydrogène sont présentées dans la première partie du Tableau 2-2. D'une manière générale, les réactions utilisant de l'hydrogène sont thermodynamiquement favorables et couvrent plusieurs étapes de la digestion anaérobie : acidogenèse, homoacétogenèse, sulfato-réduction et

méthanogenèse (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Guo *et al.*, 2010). Ceci s'explique par le fait que l'hydrogène est un vecteur énergétique de choix pour de nombreux micro-organismes (Liu *et al.*, 2013). Ainsi, la consommation des molécules d'hydrogène, est accentuée par la nature gazeuse de ce composé, qui permet sa diffusion rapide dans le milieu.

L'homoacétogenèse s'exprime principalement dans le cas de fortes concentrations en hydrogène pour réduire les inhibitions. Ainsi, l'homoacétogenèse est une réaction surtout exprimée dans les écosystèmes sans activité méthanogène (fermentaires ou digesteurs anaérobies inhibés) et à faible teneur en ions sulfates (Figure 2-9) (Harper & Pohland, 1986). Cependant, l'hydrogène peut être utilisé comme substrats pour la production d'AGV, tels que l'acide propionique ou butyrique (Nielsen, Uellendahl & Ahring, 2007; Li *et al.*, 2012) ou du sulfure d'hydrogène. Enfin, la méthanogenèse permet également la consommation de l'hydrogène en méthane par la voie hydrogénotrophe. Ainsi, bien que les voies associées à l'hydrogène soient à priori favorables, les fortes concentrations en hydrogène favorisent la production de composés lentement dégradables (acide propionique) ou toxiques (H_2S).

2.2.2.1.3 Voies fermentaires dissociées du métabolisme de l''hydrogène

Une liste non exhaustive des réactions fermentaires dissociées de l'hydrogène est présentée dans la troisième partie du Tableau 2-2. Les réactions listées sont classées en fonction de leurs énergies libres de Gibbs standards ($\Delta G°'$). Ces réactions concernent principalement des métabolismes producteurs de molécules compétitrices des voies hydrogénotrophes (solvantogenèse) (Guo *et al.*, 2010), ou bien des métabolismes producteurs d'acide acétique dissociés de l'hydrogène (acétogenèse) (Latrille *et al.*, 2011). Ces réactions produisent donc de nombreuses molécules dont des acides gras volatils (de 2 à 6 atomes de carbones), des alcools (éthanol ou butanol), des acides organiques (acides lactiques, succiniques ou formiques) ou des cétones (acétone). Cependant, l'acide butyrique n'est pas présent en tant que produit de ce type de réactions. Ainsi, la production de l'acide butyrique semble indissociable de l'hydrogène dans des conditions classiques de fermentation.

2.2.2.1.4 Voies non principales de la méthanisation

De très nombreuses réactions minoritaires ont été mentionnées dans la littérature (Stadtman *et al.*, 1949; Michel-Savin, Marchal & Vandecasteele, 1990; Moletta, 2008). Elles peuvent font intervenir des molécules particulières tels que les acides formique, succinique, lactique ou conduire à des productions/consommations d'AGV et d'hydrogène dans des ratios divers. Ces réactions peuvent notamment apparaitre dans des conditions environnementales particulières telles qu'un pH acide ou de fortes concentrations en inhibiteurs par exemple (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000; Zhang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012).

2.2.2.2 Pouvoir inhibiteur des produits de fermentation

Les intermédiaires de la digestion anaérobie ont une action inhibitrice sur la digestion anaérobie : acides organiques, hydrogène, ammoniac et sulfure d'hydrogène. Leur production est donc fondamentale pour la méthanisation du substrat mais leur consommation ou évacuation doit suivre un rythme suffisant pour ne pas s'accumuler et bloquer la méthanogenèse. Dans la littérature, les seuils d'inhibition ont été étudiés principalement en voie humide. Ceux-ci dépendent des conditions opératoires et en particulier du pH, de la température et de l'acclimatation de l'écosystème (Chen, Cheng & Creamer, 2008). Cependant, très peu d'études apportent des éléments d'information en voie sèche.

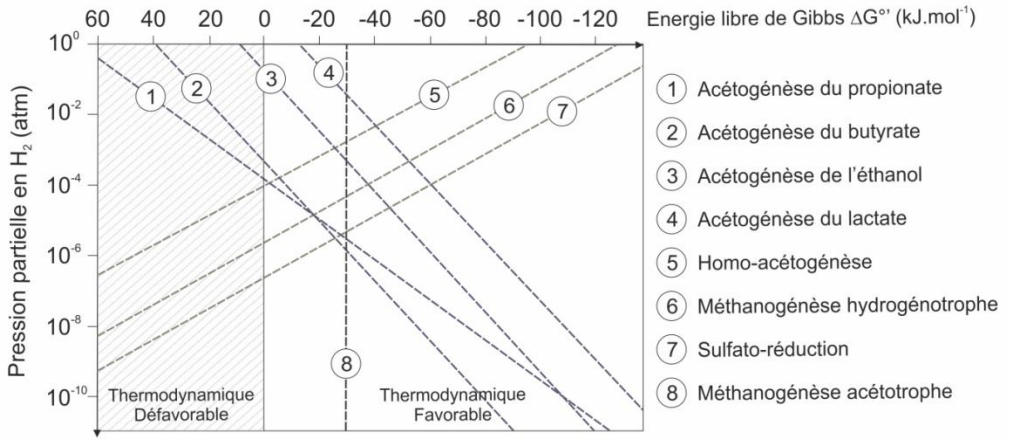


Figure 2-9 : Evolution des énergies libres standard des réactions de transformation de l'hydrogène et de consommation de l'acide acétique en fonction des pressions partielles en hydrogène.

Données pour : 25 mM d'acide acétique, 10 mM d'éthanol et d'acide propionique, butyrique et lactique, 5 mM de sulfates, 20 mM de bicarbonate et 0,7 atm de pression partielle en méthane. D'après (Harper & Pohland, 1986).

L'hydrogène est un inhibiteur de la méthanisation, principalement en ralentissant la dégradation des AGV (Amani, Nosrati & Sreekrishnan, 2010). Le pouvoir inhibiteur de l'hydrogène a été observé pour de faibles concentrations, de l'ordre de 10^{-2} atm (Ahring & Westermann, 1988). D'un point de vue thermodynamique, les réactions de consommation d'hydrogène sont favorisées vis-à-vis des réactions de production. Ainsi, l'effet inhibiteur de l'hydrogène est naturellement réduit par une forte tendance à consommer l'hydrogène (Figure 2-9). L'homoacétogenèse permet alors de maintenir basse la pression partielle en hydrogène par transformation de l'H_2 en acide acétique (Moletta, 2008). Enfin, puisque la diffusion des gaz est un paramètre clé au sein des écosystèmes par voie sèche (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), l'hydrogène semble être un des inhibiteurs principaux de la digestion sèche.

Les inhibitions dues aux trois principaux AGV produits en méthanisation (acides acétique, propionique et butyrique) sont les plus étudiées. Cependant, les seuils d'inhibition

varient grandement en fonction des milieux. Ceci s'explique notamment par la plus forte inhibition des AGV dans leur forme dissociée (Amani *et al.*, 2010) présente majoritairement en conditions acides. Ainsi, le pH, et donc l'alcalinité, jouent un rôle prépondérant sur la toxicité des AGV (Ahring, Sandberg & Angelidaki, 1995; Veeken & Kalyuzhnyi, 2000). Néanmoins, des seuils d'inhibitions d'environ 2 $g.L^{-1}$ sont relevés en voie humide (Siegert & Banks, 2005; Van Ginkel & Logan, 2005). En voie sèche, les concentrations en AGV peuvent être beaucoup plus importantes. Ainsi, des concentrations de 9 à 10 $g.L^{-1}$ d'acide acétique, 2 à 5 $g.L^{-1}$ propionique, et 1 à 5 $g.L^{-1}$ butyrique peuvent être retrouvées dans des digesteurs par voie sèche non inhibés (Staley, de Los Reyes & Barlaz, 2011; Wang, Xu & Li, 2013).

L'azote, bien qu'étant un nutriment important de la digestion anaérobie, est inhibiteur de la méthanisation sous sa forme ammoniacale (NH_4^+) et en particulier de la méthanogenèse acétoclastique (Hansen, Angelidaki & Ahring, 1998). La forme libre de l'azote ammoniacal, l'ammoniac (NH_3), est particulièrement inhibitrice et met donc en évidence l'importance du pH, de la température et des équilibres chimiques sur les inhibitions (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, les seuils d'inhibition de l'ammoniac (NH_3), reportés en voie humide, sont de 1 à 2 $g.L^{-1}$ pour des pH proches de la neutralité (Hansen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2008), contre 4 $g.L^{-1}$ en voie sèche (Wang *et al.*, 2013).

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est le produit de la sulfato-réduction qui entre en compétition pour la production de méthane. L'H_2S est la forme la plus fortement inhibitrice de la digestion anaérobie (Chen *et al.*, 2008). La toxicité aigüe de ce composé est particulièrement prononcée sur les *Archaea* méthanogènes (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Les concentrations inhibitrices reportées en voie humide sont de l'ordre de 100 à 800 $mg.L^{-1}$ d'H_2S dissous. Ces variations proviennent également du rôle du pH du milieu qui agit sur l'équilibre entre sa forme ionique (HS^-) et sa forme gazeuse (H_2S).

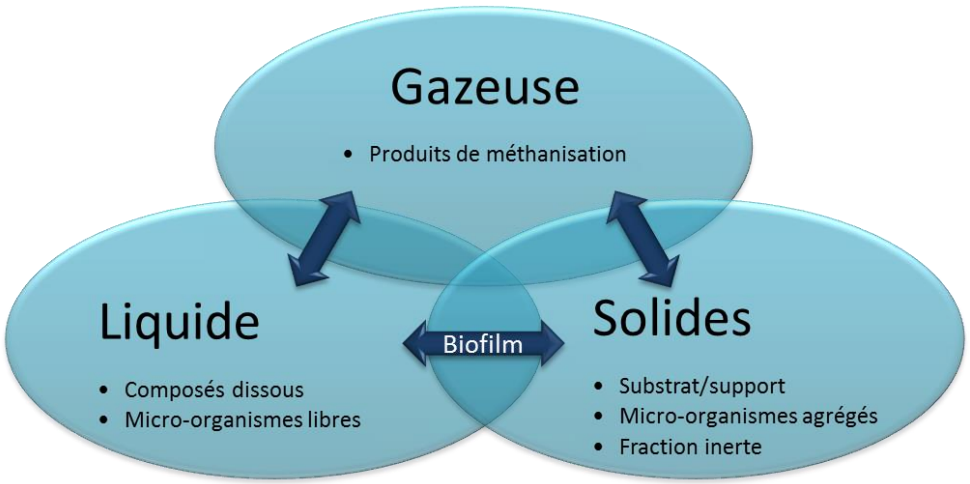


Figure 2-10 : Milieux poly-phasiques en digestion sèche de résidus solides.

2.2.3 DÉVELOPPEMENT MICROBIEN EN VOIE SÈCHE

Le milieu de digestion des déchets solides est polyphasique (Figure 2-10), constitué d'une phase solide (substrats, fraction inerte et micro-organismes agrégés), d'une phase liquide (produits solubilisés et micro-organismes libres) et d'une phase gazeuse (produits des réactions) (Escudié, 2011). La faible proportion de phase soluble dans les procédés par voie sèche limite fortement la mobilité des micro-organismes, la diffusion des composés dissous (substrats et produits de réactions) et également les phénomènes de transfert entre phase solide, liquide et gazeuse. Pour maximiser le développement et le maintien d'un activité microbienne efficace, il est actuellement supposé qu'une forte stratification des micro-organismes dans les milieux secs est mise en place (Martin, 2001). Effectivement, les faibles teneurs en eau libre laissent à supposer que les micro-organismes libres ne sont pas prédominants dans ce type d'environnement. Dans le cas de la biodégradation des déchets solides, l'interface solide/liquide est un élément clé de la bioconversion, puisque l'hydrolyse du solide est limitante (Philippidis & Smith, 1995; Vavilin *et al.*, 2008). Pour réaliser cette hydrolyse, la formation d'un biofilm sur le substrat est l'hypothèse actuellement privilégiée (Vandevivere *et al.*, 2002; Kusch *et al.*, 2011). La définition même des biofilms ne fait pas consensus. Néanmoins, il est possible de définir les biofilms comme l'ensemble des micro-organismes adhérés à un support. Selon ce concept, le solide est à la fois substrat et support de la biomasse microbienne.

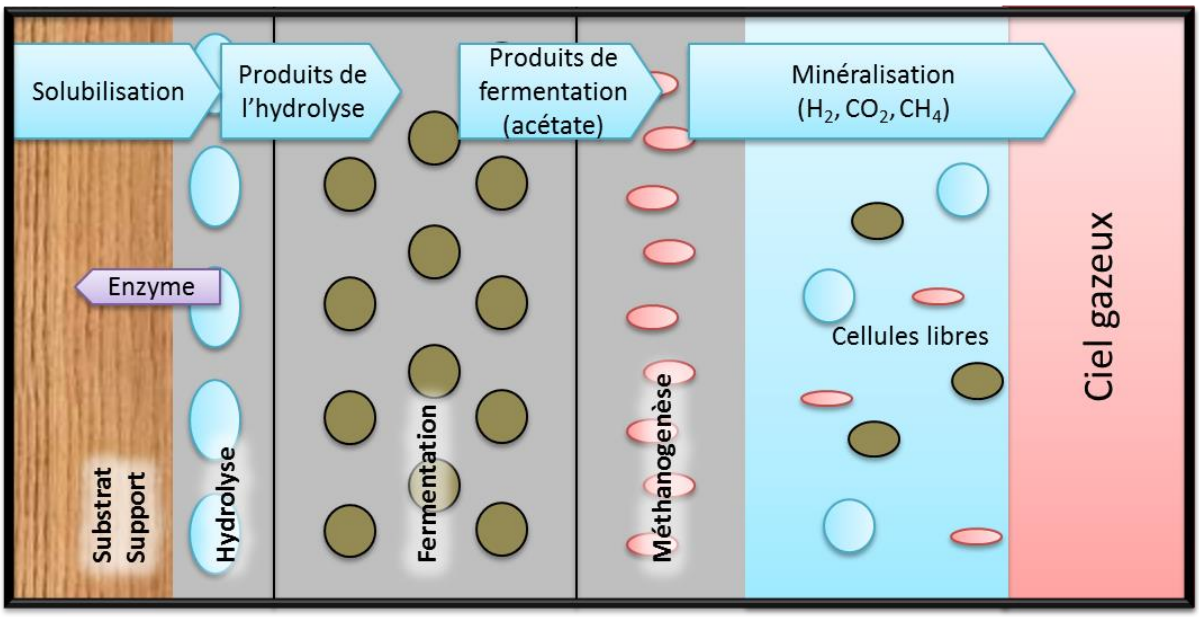


Figure 2-11 : Le modèle théorique du biofilm dans les systèmes poly-phasiques non limités en eau.
Adapté de (Wang & Chen, 2009).

2.2.3.1 Hypothèse de développement microbien sur substrat dégradable

L'arrangement en biofilm est un mode largement observé dans de nombreux types d'écosystèmes par rapport des cultures planctoniques (libres) (Stoodley, Sauer & Davies, 2002). Un biofilm est une structure microbienne complexe. Les micro-organismes sont imbriqués dans une matrice extracellulaire (ExoPolymeric Substances, EPS) et fixés sur une interface. Il est généralement admis que le développement du biofilm et sa différenciation est un processus en plusieurs étapes : l'attachement initial, l'adhésion irréversible, la prolifération, la maturation et la dispersion (Stoodley *et al.*, 2002). Ce mode d'organisation confère aux micro-organismes de nombreux avantages tels qu'un accès privilégié au substrat, des transferts de matière sur de courtes distances et une protection face aux stress environnementaux. De plus, les échanges intra et inter-espèces y sont favorisés, ce qui est particulièrement utile pour les écosystèmes syntrophiques tels que ceux de la digestion anaérobie (Amani *et al.*, 2010). Pour finir, la structure confinée du biofilm peut offrir de bonnes conditions pour la rétention des enzymes extracellulaires augmentant ainsi leur action (Wang & Chen, 2009).

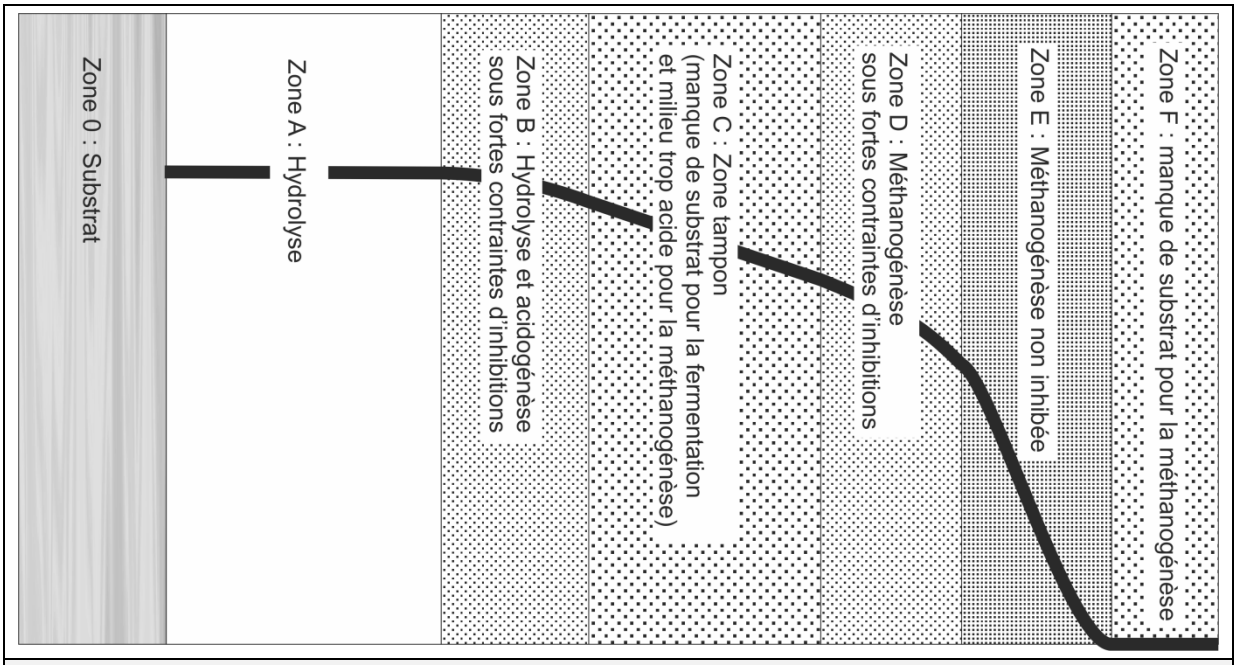


Figure 2-12 : Hypothèse de stratification des biofilms en voie sèche.
La courbe représente l'évolution de la concentration en produits de l'hydrolyse selon le concept de stratification. D'après (Martin, 2001).

Pour ces raisons, la présence de biofilm est supposée dans les systèmes de dégradation des substrats solides (Vandevivere *et al.*, 2002). A ce jour, les modèles théoriques sont surtout développés pour le cas des systèmes de digestion anaérobie en voie humide (Figure 2-11). Cependant, dans une certaine mesure, ils décrivent des phénomènes extrapolables au cas de la voie sèche, tel que le développement de micro-organismes sur des substrats-supports (Wang & Chen, 2009). Selon ces modèles théoriques, la présence de micro-organismes hydrolytiques au contact du substrat est supposée en raison de leur

grande affinité avec ce support. Les produits de l'hydrolyse sont ensuite transportés sur de courtes distances vers les micro-organismes impliqués dans l'acidogenèse et de l'acétogenèse. Pour finir, les micro-organismes méthanogènes plutôt proches de l'interface biofilm-liquide ont pour tâche de transformer les produits de la fermentation sous forme de biogaz. Dans le cas de la voie sèche, l'impossibilité technique d'analyser les biofilms dans ces milieux complexes fait, qu'à ce jour, l'identification et la structure des biofilms sur support biodégradables n'ont toujours pas été décrites avec précision.

2.2.3.2 Hypothèse de stratification microbienne en voie sèche

En voie sèche, le développement des biofilms subit des contraintes plus fortes notamment en raison des concentrations élevées en composés inhibiteurs dans la phase aqueuse. Ceux-ci atteignent des concentrations apparentes supérieures aux seuils généralement décrits en digestion humide (Chen *et al.*, 2008). Par conséquent, il est possible de supposer l'existence d'un mécanisme de protection à l'échelle du biofilm. Ainsi, une étude a proposé l'hypothèse selon laquelle les micro-organismes en voie sèche sont particulièrement stratifiées et séparées par des zones tampons (Figure 2-12) (Martin, 2001). Selon ce modèle plus spécifique à la voie sèche, l'organisation des micro-organismes est orientée vers la protection de la zone de méthanogenèse vis à vis des zones plus riches en métabolites, issus de l'hydrolyse et de l'acidogenèse. Cette protection est réalisée par des épaisseurs (films) de couche à priori totalement inhibées mais régulant les transferts de matière jusqu'aux zones de la méthanogenèse. Selon cette hypothèse, le flux de produit de l'hydrolyse du substrat serait le flux limitant l'avancement de la réaction. Cette limitation semble impacter l'étape de méthanogenèse notamment lors de la phase de démarrage des digesteurs batchs (Shi *et al.*, 2013).

L'une des limites de ce modèle réside dans l'hypothèse selon laquelle toute perturbation de la structure stratifiée peut nuire au fonctionnement global de digestion anaérobie par une inhibition brutale des méthanogènes. Ces perturbations peuvent survenir lors d'une agitation ou par une réduction de taille des particules. Récemment, une étude a tenté de vérifier ce modèle (Staley *et al.*, 2011). Cependant, l'approche choisie, consistant à étudier des tronçons de 1 cm^3 de milieu (métabolites et communautés microbiennes) n'a pas permis de valider ou d'invalider ce concept. Cette absence de validation est principalement due à l'échelle choisie qui était de l'ordre du centimètre alors que les processus impliqués sont de l'échelle du micromètre.

2.2.3.3 Impact des paramètres opératoires sur la stratification microbienne

Le modèle théorique des biofilms en voie sèche suppose donc une stratification microbienne compartimentant les différentes étapes de la digestion anaérobie. De nombreuses contraintes environnementales ont potentiellement des effets sur la croissance des micro-organismes et leur stratification. D'une manière générale, plusieurs types de

paramètres ont été décrites en voie humide (Goller & Romeo, 2008) : l'hydrodynamique, les propriétés du support et les paramètres environnementaux.

La notion de contraintes hydrodynamiques ne semble pas concerner la voie sèche en raison de la rhéologie des milieux (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Cependant, cette notion est liée à l'agitation. Celle-ci peut présenter des effets positifs supposés, tels qu'une propagation facilitée du biofilm sur le substrat. Cependant, la mise en contact de micro-organismes non inhibés avec des concentrations importantes en inhibiteurs suppose un effet négatif de l'agitation. (Martin, 2001).

Les paramètres environnementaux concernent les phénomènes impactant l'environnement immédiat des micro-organismes et en particulier le pH, la température et la présence de substrats et de composés inhibiteurs (Goller & Romeo, 2008). Si la température est généralement contrôlée en digestion anaérobie, le pH évolue en fonction de l'avancement de la réaction, de l'alcalinité et de la concentration en acides organiques. Ces facteurs agissent en favorisant ou limitant la croissance, les cinétiques de dégradation et les voies métaboliques des micro-organismes.

Puisque le support est également le substrat, ses propriétés évoluent au fil de la dégradation. Ainsi, la complexité intrinsèque du substrat ainsi que son évolution induit des effets sur la structure de l'écosystème microbien. Cette adaptation progressive des micro-organismes est à la fois la conséquence d'une recherche de substrat et d'une adaptation aux produits de dégradation (Andersson, 2002; Pohl, Heeg & Mumme, 2013). La compartimentation microbienne évolue donc en fonction de l'avancement de la réaction biologique (O'Sullivan *et al.*, 2005).

2.2.3.4 Etude de la compartimentation microbienne

La structure des communautés microbiennes en digestion anaérobie par voie sèche n'a à ce jour pas été étudiée. La complexité méthodologique de ces études sur des substrats biodégradables font que même en voie humide, très peu d'études ont été menée (Ahn, Choi & Byeon, 1995; Jensen, Hardin & Clarke, 2008; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Les difficultés méthodologiques proviennent de la forte diversité microbienne ne permettant pas l'identification et l'étude des micro-organismes actifs, la structure tridimensionnelle des résidus végétaux limitant les observations microscopiques ou encore l'impact des solutions employés pour la compartimentation microbienne.

2.2.3.4.1 Outils d'analyses microbiologiques

L'étude microbiologique des biofilms mixtes est principalement réalisée par des approches de biologie moléculaire et de microscopie (Habouzit, 2010). La biologie moléculaire permet d'analyser les communautés microbiennes en présence, d'identifier les espèces présentes ainsi que les voies métaboliques exprimées. Ces outils extrêmement variés permettent donc de caractériser la structure des communautés microbiennes, la

distribution des populations microbienne (*Archaea* vs. bactéries) ou d'identifier les micro-organismes présents (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Selon les techniques, il est également possible de suivre l'évolution des communautés microbiennes en dynamique. Parmi les différentes techniques, il est ainsi possible de citer :

- Les techniques d'empreinte moléculaire des communautés microbiennes (telles que la DGGE ou la SSCP) pour identifier la structure des communautés microbiennes et d'extraire la diversité microbienne.
- Les techniques de quantification d'ADN (PCR quantitative) pour connaitre la concentration en micro-organismes.
- Le pyroséquencage de l'ADN permettant l'identification des micro-organismes.
- La métagénomique pour l'identification de l'expression des gènes des micro-organismes.

Ces outils sont appliqués à partir de la totalité d'un échantillon, mais ne fournissent pas d'informations sur la spatialisation des micro-organismes.

2.2.3.4.2 Observations microscopiques

L'observation directe, par microscopie, permet de décrire la structure et la morphologie des biofilms. Deux approches sont généralement adoptées en fonction de la précision recherchée et de la nature des échantillons (Hannig *et al.*, 2010) :

- La microscopie confocale laser après marquage de l'ADN microbien pour révéler la structure et la densité cellulaire des biofilms.
- La microscopie à balayage (en anglais scanning electron microscopy ou SEM) pour visualiser la morphologie du biofilm.

Ces outils sont particulièrement adaptés pour étudier la structuration et la mise en place des micro-organismes sur une surface inerte et plane (Roblin, 1998). Cependant, l'observation des biofilms sur des supports dégradables est fortement limitée par la structure tridimensionnelle du support et son évolution au cours de la dégradation. Par conséquent, les études de la colonisation des substrats lignocellulosiques par les biofilms sont généralement réalisées par une simplification du support (cellulose pure) et/ou de la biomasse microbienne (cultures pures) (Ahn *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 2005). Ces approches reflètent donc mal la complexité des écosystèmes anaérobies.

2.2.3.4.3 Compartimentation microbienne

Des techniques alternatives reposant sur le fractionnement des cellules en fonction de leur degré d'adhésion avec le support ont été proposées pour caractériser la compartimentation des communautés microbiennes (Zhang *et al.*, 2007b; Jensen *et al.*, 2008). Ces protocoles d'extraction permettent d'étudier la compartimentation microbienne sur des supports biodégradables par des centrifugations successives des digestats avec des solutions tampons. Ainsi, 20% des micro-organismes resteraient fortement liés à la matrice

sous forme de « biofilm » (Jensen *et al.*, 2008). Cependant ce résultat étant obtenu sur des billes de cellulose, il n'est pas possible d'extrapoler cette donnée à des substrats lignocellulosiques complexes. Enfin, si ces protocoles permettent de compartimenter la biomasse microbienne, le contenu de ces compartiments (cellules planctoniques ou adhérés) n'a pas été validé par des études approfondies.

2.2.4 CONCLUSIONS SUR L'ÉCOSYSTÈME DE DIGESTION SÈCHE

La digestion anaérobie est le résultat de l'activité d'un écosystème complexe regroupant de nombreuses espèces microbiennes permettant la dégradation d'un substrat complexe en plusieurs produits, le principal étant le méthane. Les quatre étapes de la digestion anaérobie conduisent à la formation de divers produits intermédiaires qui sont utilisés comme substrats des réactions ultérieures. Ces composés, hydrogène et acides gras volatils notamment, sont principalement issus de l'hydrolyse et de l'acidogenèse. Ces étapes sont réalisées par des micro-organismes fermentaires au métabolisme rapide. L'hydrogène et les AGV doivent être dégradés par des micro-organismes à faible taux de croissance que sont les micro-organismes acétogènes et méthanogènes. Par conséquent, la mise en place de l'écosystème efficace doit permettre l'hydrolyse du substrat tout évitant l'inhibition de méthanogenèse. Ainsi, il est préférable de favoriser des voies fermentaires produisant des métabolites facilement assimilables (acide acétique par exemple), de favoriser l'activité méthanogène ou encore de maximiser la compartimentation des différentes communautés dans l'hypothèse où la compartimentation est favorable à la dégradation. L'hypothèse selon laquelle la biomasse microbienne se développe sous forme de biofilm permet de répondre à ces critères. En effet, cette structure offre une protection face aux contraintes environnementales ainsi qu'une maximisation de l'efficacité par une réduction des distances entre substrats et micro-organismes. A ce jour, aucune validation du modèle de stratification ou du développement sous forme de biofilm n'a été réalisée. Ceci s'explique par les techniques d'étude des biofilms qui ne sont pas adaptées au cas des supports biodégradables et à la faible teneur en eau du milieu d'étude. Pourtant, la compréhension de la structure des micro-organismes en voie sèche est un enjeu majeur pour la compréhension de leur fonctionnement.

2.3 SUBSTRAT LIGNOCELLULOSIQUE

2.3.1 LA PAILLE DE BLÉ : UN SUBSTRAT MODÈLE

Les résidus lignocellulosiques regroupent l'ensemble de la matière organique issue des résidus agricoles et sont principalement composés de trois polymères : cellulose, hémicelluloses et lignines. Ces polymères sont les plus abondants à la surface de la terre puisqu'ils sont les composants principaux des végétaux (Pandey, 2004). La lignocellulose représente un potentiel énergétique important puisqu'elle est composée de polysaccharides. Ainsi, cette ressource potentielle est activement étudiée pour la production de bioénergies, de biocarburants ou de biomolécules (Clark *et al.*, 2009; Kaparaju *et al.*, 2009). La production de biomasses lignocellulosiques dédiée à la production énergétique (cultures énergétiques) est parfois envisagée mais vivement critiquée puisqu'elle entre en compétition avec la production de cultures dédiées à l'alimentation (Alexandre *et al.*, 2012). De plus, de nombreuses activités humaines produisent des résidus lignocellulosiques. En particulier, des gisements importants sont liés aux résidus de l'agriculture (pailles, tiges, tourteaux), aux résidus d'élevages (fumiers), aux ordures ménagères (cartons et papiers) ou certains déchets industriels (agroalimentaires) (Moletta, 2008; EEA, 2013). Parmi ces gisements, les résidus agricoles présentent l'avantage d'une production abondante, répartie sur le territoire et facilement utilisable pour les bioprocédés en raison de leur composition et de leur siccité.

Biomasses forestières (1-35)
- ✓ Tronc (1-19)
- ✓ Ecorces (20-24)
- ✓ Brindilles (25-28)
- ✓ Feuilles (29-32)
- ✓ Autres (33-35)

Biomasses herbacées et agricoles (36-88)
- ✓ Herbes (36-47)
- ✓ Pailles (48-56)
- ✓ Tiges (57-61)
- ✓ Fibres (62-64)
- ✓ Coquilles (65-74)
- ✓ Noyaux (75)

Autres résidus (76-88)
Biomasses animales (89)
Biomasses contaminée (90-93)

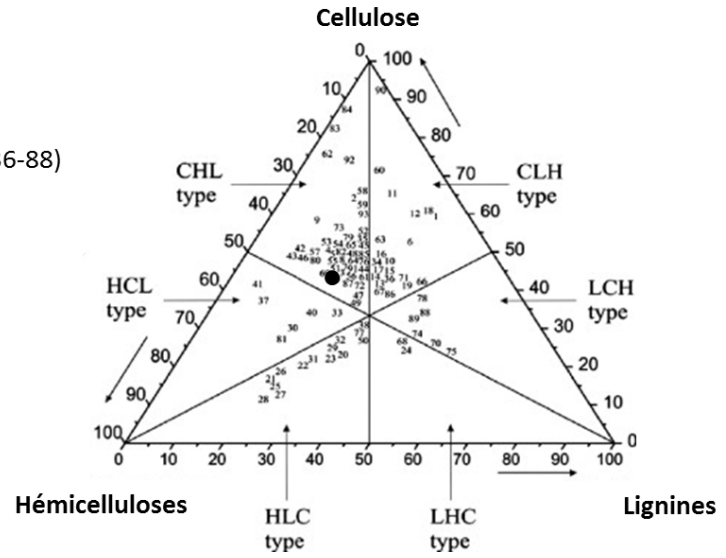


Figure 2-13 : Composition de la paille de blé vis-à-vis du spectre de substrats lignocellulosiques.
La paille de blé est représentée par un point noir. D'après (Vassilev *et al.*, 2012).

Parmi le spectre de substrats lignocellulosiques pouvant être utilisés pour la méthanisation, la paille, et en particulier la paille de blé, se présente comme modèle de choix. Le blé est une plante annuelle du taxon monophylétique des angiospermes dont la culture est très répandue à la surface du globe et en particulier en Europe et Asie (75% de la production mondiale en 2011, FAOSTAT juin 2013). Le gisement de paille de blé représente donc un potentiel très important puisqu'environ 10 millions de tonnes de pailles de blé (24 millions toutes pailles confondues) sont récoltées chaque année en France (Ademe, 1998). Or, la composition de la paille (Figure 2-13) est intermédiaire vis-à-vis des autres substrats lignocellulosiques (Vassilev *et al.*, 2012). Par conséquent, la paille de blé est un modèle idéal pour les études portant sur la valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique et la compréhension des mécanismes clés lors de leur dégradation. Cependant, ce substrat présente des hétérogénéités au niveau macroscopique (morphologie), microscopique (histologie), ultrastructural (cytologie) et biochimique impactant les utilisations de cette biomasse.

2.3.2 MATRICE LIGNOCELLULOSIQUE

Les polymères contenus dans la paille de blé (cellulose, hémicelluloses, lignines) sont fortement imbriqués, formant ainsi une structure complexe : le tissu lignocellulosique.

2.3.2.1 Cellulose

La cellulose est quantitativement le polymère le plus présent sur terre. Elle constitue une fraction importante des parois végétales dont elle assure la structure. La cellulose (Figure 2-14) est un homopolymère linéaire de longues chaines d'unités de D-glucose ramifiées entre elles par des liaisons glycosuriques β-1,4 (Nougarède *et al.*, 1969). Un dimère de glucose, appelé cellobiose, forme le motif élémentaire de la cellulose. La formule générale de ce polymère est $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+n}$, où n représente le degré de polymérisation. Ce polymère présente une forte tendance à s'associer linéairement formant ainsi des chaines de longueurs variables pouvant atteindre 16 000 unités de glucose (Sun, 2010).

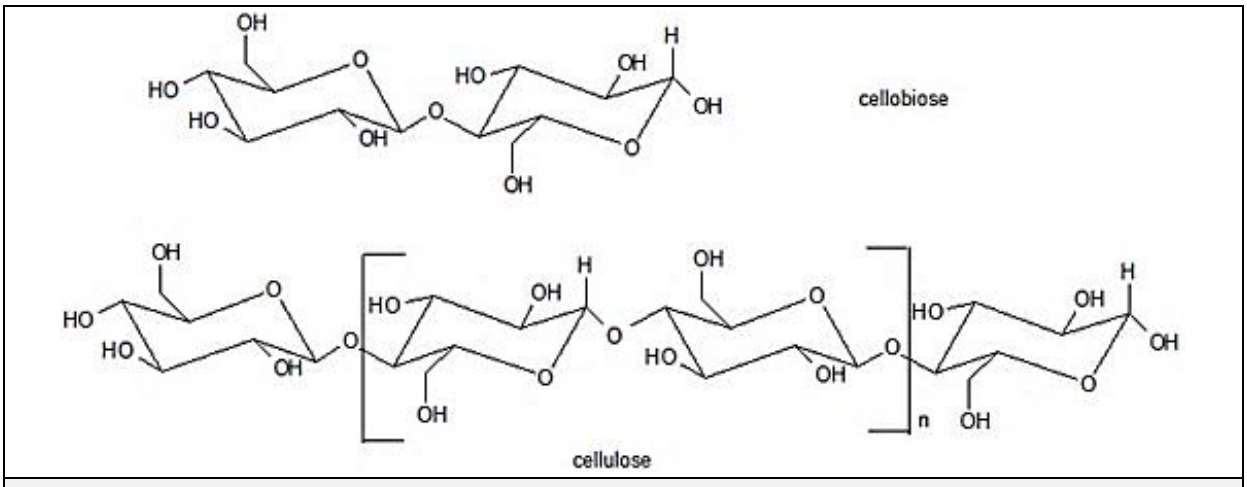


Figure 2-14 : Fragment de chaine cellulosique.

Ces chaines moléculaires sont appelées microfibrilles et peuvent présenter deux formes en fonction du degré d'organisation de leur structure. Ainsi, la cellulose dite cristalline correspond à la forme la plus ordonnée possible du polymère et s'oppose à la cellulose dite amorphe (Monlau *et al.*, 2013). La cellulose amorphe présente d'importants espaces interfibrillaires favorables à des inclusions de lignines, mais aussi aux attaques microbiennes et enzymatiques. Le haut degré d'organisation de la cellulose cristalline la rend récalcitrante à la biodégradation. Par conséquent, le taux de cristallinité, traduisant le rapport entre la forme cristalline et la forme amorphe de la cellulose, est un indicateur de la biodégradabilité de la cellulose.

2.3.2.2 Hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent la seconde famille de polymères de la lignocellulose. Celles-ci sont essentielles dans la structure des parois cellulaires pour assurer la cohésion entre les cellules végétales et les différentes parois cellulaires. Les hémicelluloses correspondent à un ensemble de polymères, de composition variable, variant principalement en fonction des végétaux. Une grande variété de monomères compose les hémicelluloses : xylose, arabinose, glucose, galactose, mannose, fucose, acide glucuronique et acide galacturonique (Sun, 2010). Les hémicelluloses forment des liaisons hydrogènes avec la cellulose, et des liaisons covalentes avec la lignine. Ce polymère au degré de polymérisation plus faible que celui de cellulose (80 à 200) possède une composition chimique variable en fonction de la présence de pentose $(C_5H_8O_4)_n$ ou d'hexose $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Nougarède *et al.*, 1969).

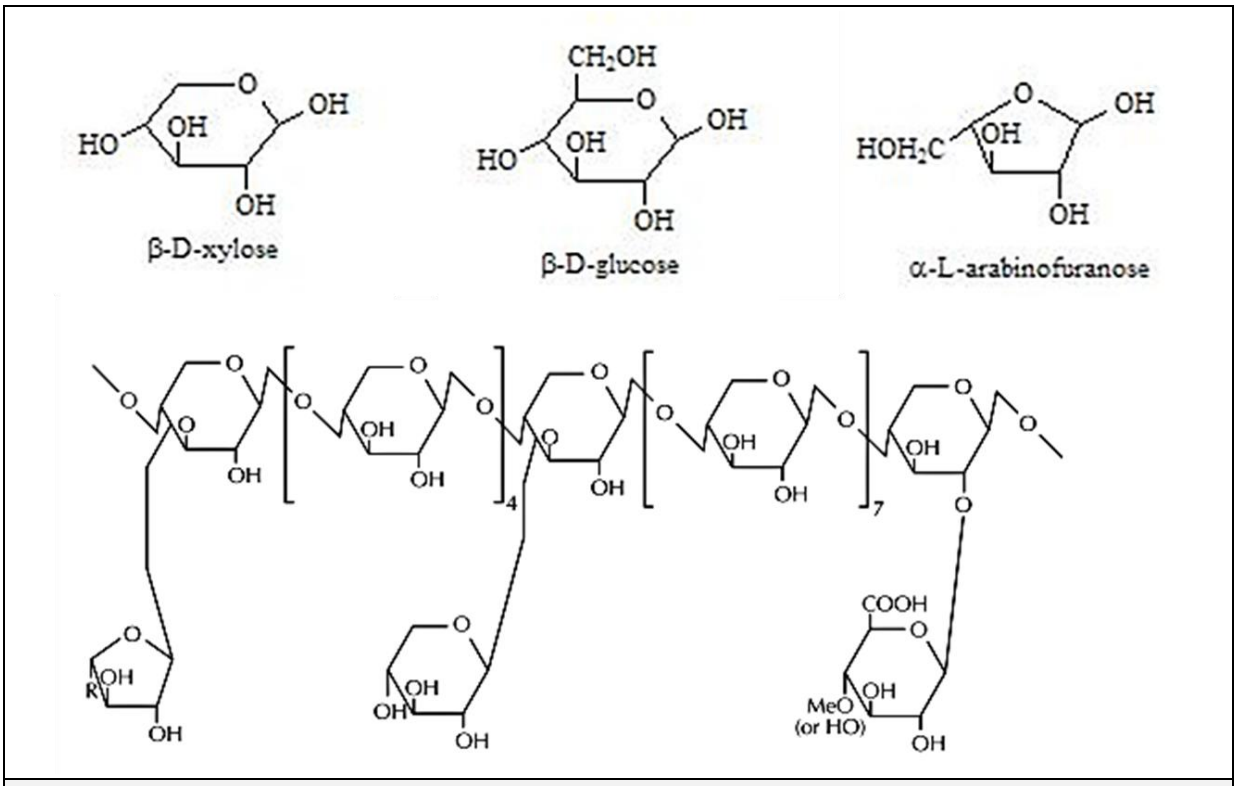


Figure 2-15 : Principaux monomère et structure typique des hémicelluloses de paille de blé. D'après (Sun, 2010).

La paille de blé est quant à elle principalement composée d'unités de xyloses reliées par des liaisons β-1,4 et pouvant être substituées par des arabinoses (Figure 2-15) (Sun, 2010). Ces structures sont appelées les arabinoxylanes. Une forte substitution des arabinoxylanes correspond à une augmentation du rapport arabinose/xylose (Ara/Xyl). Il a été démontré qu'un fort ratio Ara/Xyl induit généralement une faible dégradabilité des hémicelluloses (Chesson, Gordon & Lomax, 1983; Bertrand *et al.*, 2006). Par conséquent, les biomasses contenant des hémicelluloses majoritairement constituées de xylose possèdent un potentiel de dégradation plus élevé. La paille de blé présente généralement un degré de substitution plutôt faible vis-à-vis d'autres substrats lignocellulosiques (Brown *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Lignines

Les lignines constituent la troisième famille de polymères de la lignocellulose. Les lignines sont des composants importants des parois cellulaires végétales notamment pour leur rôle de rigidification. Une variabilité importante de la composition et de la structure des lignines existe au sein des plantes. Les lignines (Figure 2-16) sont des hétéropolymères constitués de trois types d'alcools phénylpropanes : p-coumaryl (H), coniferyl (G) et sinapyl (S) (Ralph *et al.*, 2004). La proportion et la quantité d'unités H, G ou S d'un polymère varie grandement en fonction de la plante, de sa maturité ou du rôle de la cellule végétale. Il est néanmoins noté que chaque plante présente un type de lignines particulier (Monlau *et al.*, 2013). Cependant, les tissus des angiospermes, dont les pailles de céréales, contiennent des proportions similaires d'unités G et S mais moins d'unités H (Sun, 2010). Contrairement à la

cellulose et aux hémicelluloses, les lignines sont considérées comme non biodégradables en digestion anaérobie (Monlau *et al.*, 2013). Cependant, il semble que sur des réactions prolongées, une déstructuration des lignines peut survenir (Chanakya & Khuntia, 2013).

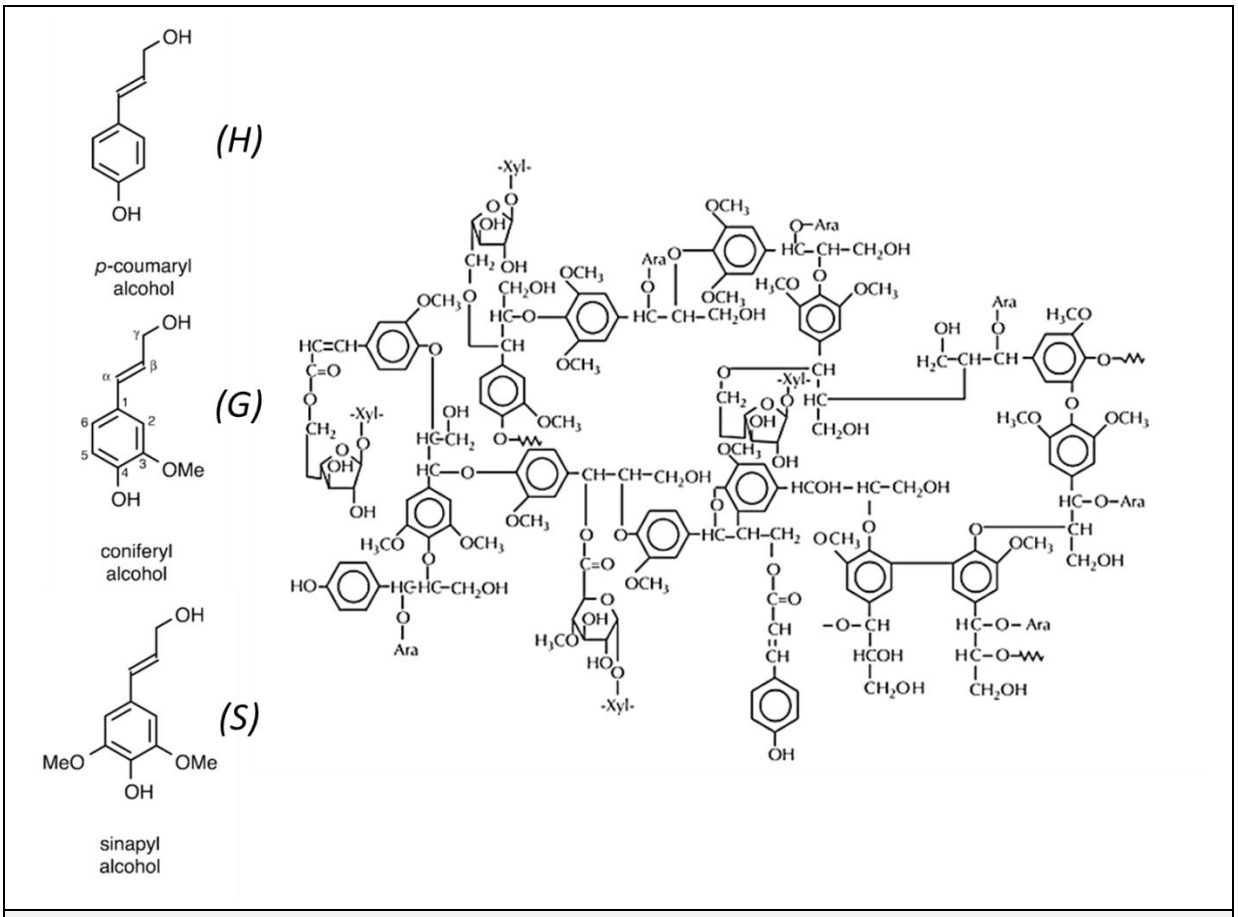


Figure 2-16 : Structure modèle des lignines de paille de blé.
D'après (Sun, 2010).

2.3.2.4 Autres composés pariétaux

Outre les trois principaux types de polymère, d'autres composés ayant une plus faible abondance participent au réseau lignocellulosique : les substances pectiques, les silices, les acides phénoliques et les cires.

Les substances pectiques possèdent un rôle important pour les parois cellulaires primaires. Ce sont des dérivés d'acides uroniques (acides galacturonique et glucuronique) formant des chaines polymériques reliées par des liaisons α-1,4 (Nougarède *et al.*, 1969). Leur association avec d'autres molécules, telles que certains sucres constitutifs des hémicelluloses (ex : arabinose), permet d'assurer la cohésion des différents polymères de la matrice lignocellulosique. La forte interaction entre les hémicelluloses et les substances pectiques font que les pectines sont souvent considérées comme partie intégrante des hémicelluloses (Monlau *et al.*, 2013). Les substances pectiques sont très solubles à l'eau et

peuvent être dégradées par des enzymes produites par de nombreux micro-organismes (Kristensen, 2008).

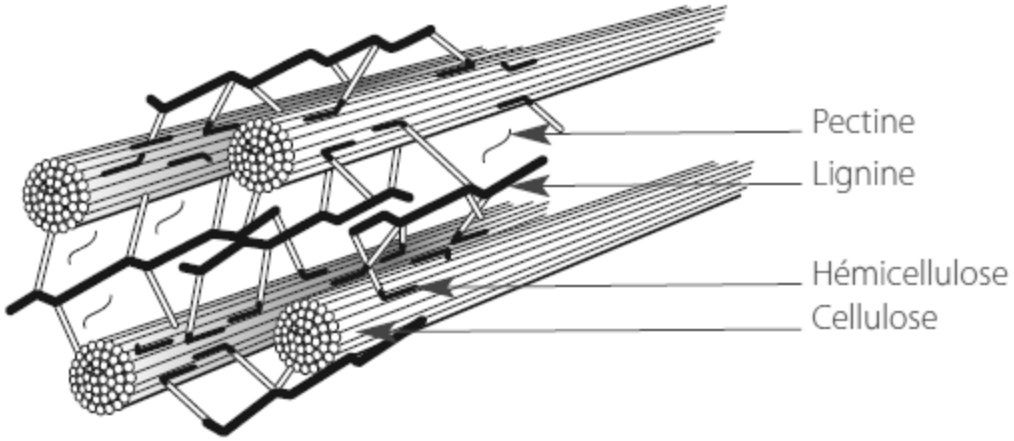


Figure 2-17 : Imbrication des polymères formant le réseau lignocellulosique.

Les silices sont particulièrement présentent dans les parois des cellules de l'épiderme (Nougarède *et al.*, 1969). Ce dépôt se fait par inclusion dans le tissu notamment pour assurer sa dureté, mais aussi pour opposer une barrière physique aux attaques enzymatiques (Currie & Perry, 2007). Parmi les végétaux, les angiospermes ont des concentrations moyennes en silices (3 à 5% MS) (Hodson *et al.*, 2005). Bien que faible, cette quantité est suffisante pour induire des difficultés lors des prétraitements des biomasses lignocellulosiques par une augmentation des résistances mécaniques (McKean & Jacobs, 1997).

Les cires et d'autres composés hydrophobes, tels que les subérines et cutines, sont excrétés au niveau de l'épiderme des plantes pour assurer son imperméabilité. Cette couche est déposée sur une couche pectocellulosique, la lamelle moyenne (Nougarède *et al.*, 1969). De par leur caractère hydrophobe, les cires représentent une barrière physique aux attaques microbiennes.

Les acides phénoliques (acide férullique et p-coumarique) participent à la cohésion des parois cellulaires par l'établissement de liaisons covalentes avec les araboxylanes ou les lignines. Ils sont présents en faible quantité mais diminuent la biodégradabilité du tissu par une plus forte imbrication des hémicelluloses aux lignines (Bertrand *et al.*, 2006). Il fut néanmoins noté que certains composés aromatiques constitutifs des lignines peuvent être transformés en biogaz par certains micro-organismes (Healy & Young, 1979).

2.3.3 HÉTÉROGÉNÉITÉS MULTI-ÉCHELLES

En plus des variabilités de compositions biochimiques, les pailles présentent des hétérogénéités très importantes de l'arrangement de la structure des organes végétaux aux arrangements des polymères au sein des cellules.

2.3.3.1 Hétérogénéités macroscopiques : morphologie végétale

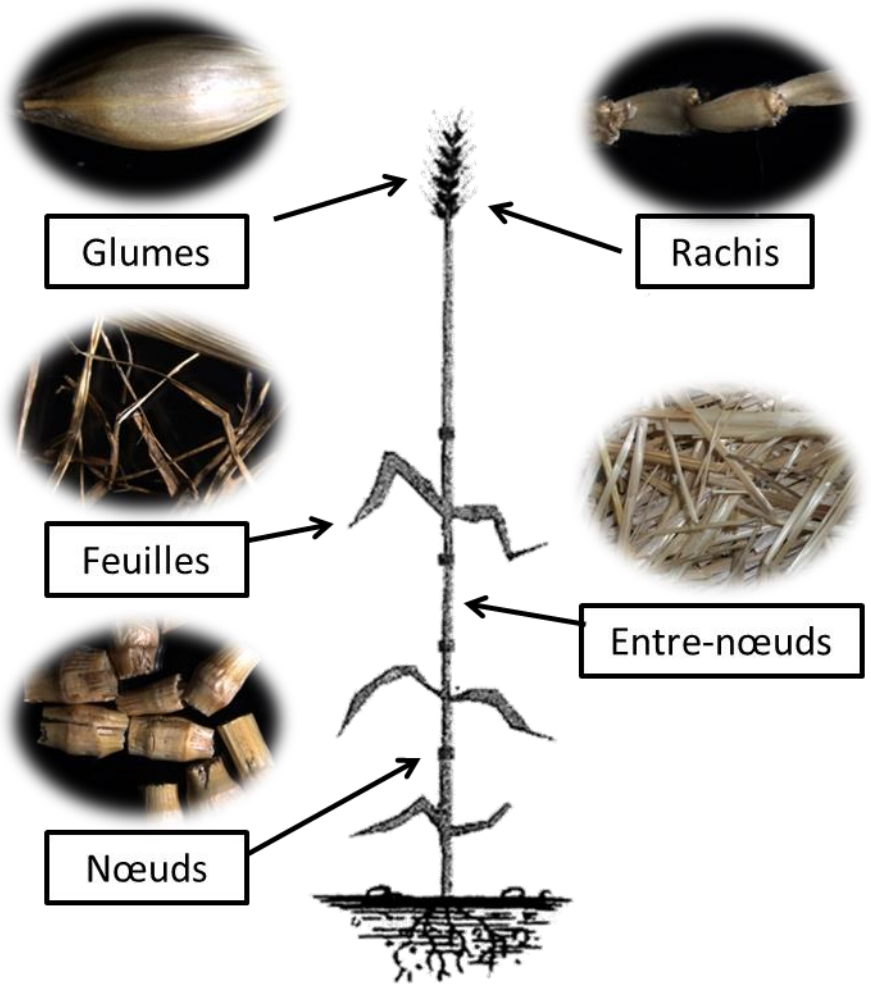


Figure 2-18 : Principaux organes du blé présent dans la paille.

Les hétérogénéités macroscopiques prennent en considération la morphologie végétale et donc la proportion des différents organes de la plante. Principalement cultivée pour sa graine, la culture du blé conduit à la coproduction d'un résidu: la paille. La récolte du blé consiste à découper la base des tiges sur une hauteur d'une dizaine de centimètre puis de séparer les grains du reste de la plante. La paille est donc composée des organes résiduaires : les tiges (entrenœuds et nœuds), les feuilles et les enveloppes, et les supports des grains (rachis et glumes) (Figure 2-18). De plus, la composition des lots de pailles de blé est dépendante de la plante (variété, maturité), du mode de récolte et des conditions de stockages (Ademe, 1998; Rincón, Banks & Heaven, 2010). Pour cette raison, les rares analyses morphologiques disponibles dans la littérature montrent de grandes variations (Figure 2-19). La méthode de caractérisation, le nombre de fractions ou encore le degré de précision dans l'analyse des lots de paille impactent fortement le fractionnement morphologique. Néanmoins, la paille de blé est globalement composée d'entrenœuds (≈ 50% en masse), de feuilles (15 à 30%) et de nœuds (≈ 10%). Le reste est constitué de

fractions fines difficilement identifiables ou des parties supérieures de la plante (rachis, glumes et grains résiduaires) dont l'abondance est fortement tributaire du mode de récolte.

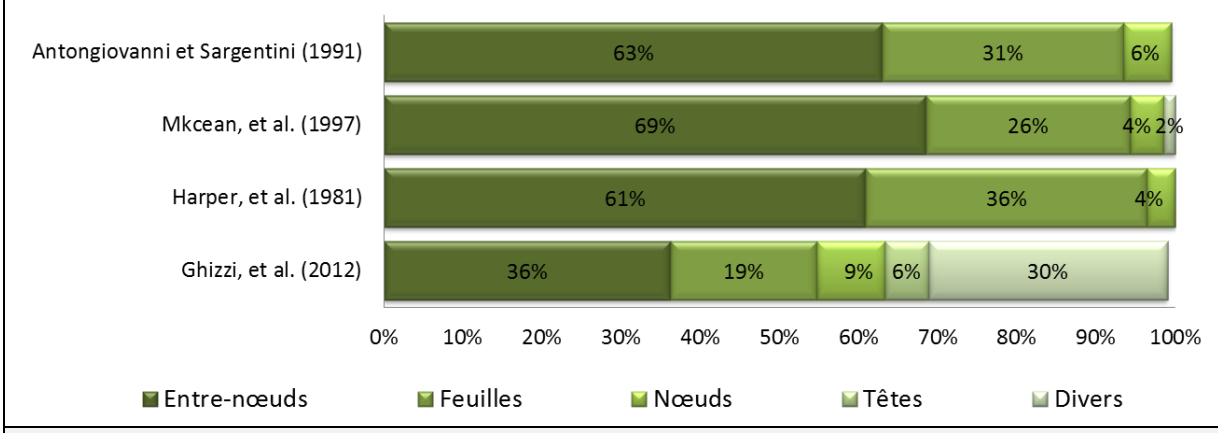


Figure 2-19 : Fractionnement morphologique de la paille, exprimé en pourcentage massique.

Les organes majoritairement présents dans la paille de blé sont donc principalement liés à la tige et aux feuilles. Les feuilles sont le siège de la photosynthèse et donc de la synthèse des molécules organiques. Le rôle des tiges est essentiellement lié au support des différents organes aériens de la plante (feuilles et fleurs), et au transport des fluides au sein de la plante. Les différentes fonctions de ces organes impliquent des variations structurelles et biochimiques dans les tissus qui les composent.

2.3.3.2 Hétérogénéités microscopiques : histologie végétale

Les organes sont composés de plusieurs types de tissus végétaux qui induisent des hétérogénéités à l'échelle microscopique. L'étude de l'histologie des végétaux montre que la structure et l'agencement des tissus sont déterminés par la fonction de l'organe. Néanmoins, un schéma général est souvent admis pour décrire cette structuration (Reece *et al.*, 2011). Ainsi, de l'intérieur de l'organe vers l'extérieur, sont trouvés (Figure 2-20): des tissus vasculaires et de synthèses (parenchyme avec inclusion de xylème et de phloème), des tissus de soutien (sclérenchyme) et des tissus superficiels (épiderme). En raison de ces différences de structure, tous ces tissus présentent des biodégradabilités différentes, tant en termes de rendement que de résistance vis-à-vis des attaques microbiennes. Si l'impact de la structure des tissus a été pris en compte pour comprendre la dégradation dans les composts (Dresbøll & Magid, 2006), les sols (Bertrand *et al.*, 2006) ou les rumens (Wilson & Mertens, 1995), ce n'est pas le cas des écosystèmes anaérobies.

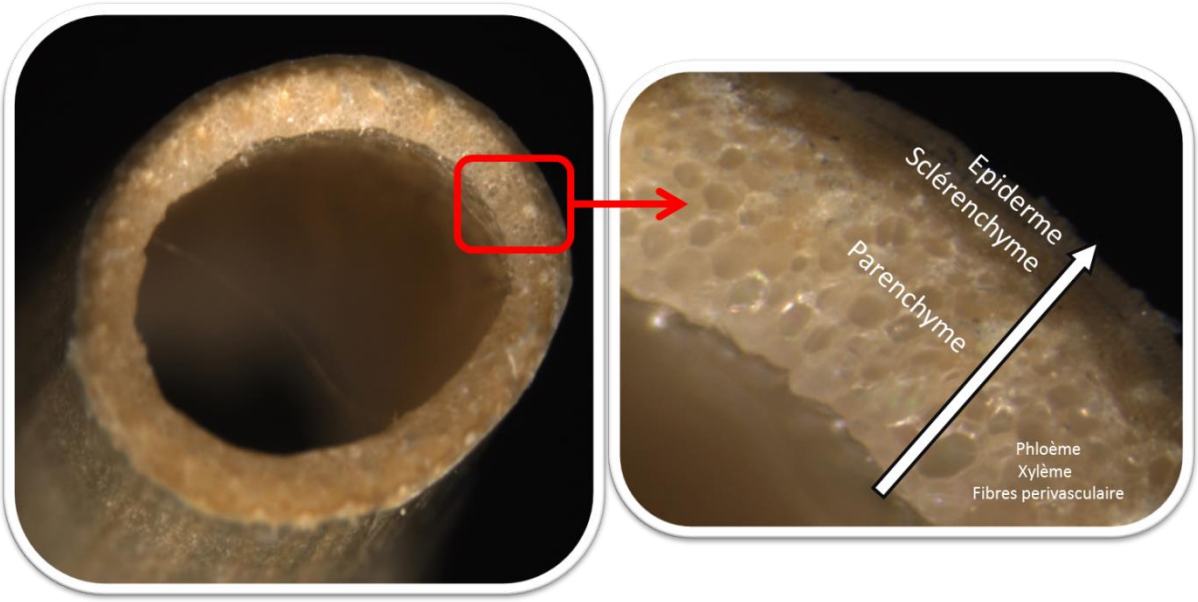


Figure 2-20 : Structure histologique d'un entrenœud de blé.

2.3.3.2.1 Tissus vasculaires et de synthèse

Les tissus assimilateurs et de réserves sont le siège des fonctions élaboratrices de la plante (photosynthèse et stockage). Parmi eux, les tissus conducteurs permettent le transfert des substances nutritives et de l'eau via la mise en circulation de sève, par deux types de tissus : le xylème et le phloème. Le xylème assure le transport de l'eau et des sels minéraux des racines aux feuilles. Le phloème permet le transport des composés élaborés par photosynthèse (issus des feuilles) vers les autres organes. Contrairement au phloème, le xylème présente une structure fortement lignifiée.

Associés aux tissus conducteurs, des tissus peu différenciés, nommés parenchymes, peuvent stocker des lipides, protéines ou polysaccharides. Ces tissus peuvent produire des substances pouvant être excrétées par la plante (résines, nectar) ou bien stockées (tannins, latex). Ces tissus sont composés de cellules végétales vivantes et relativement jeunes. Les cellules du parenchyme présentent donc des parois cellulaires fines, peu lignifiées et une large vacuole centrale. La densité du parenchyme est très faible puisqu'il représente 65 à 69% du volume de la paille de blé pour seulement 30% de la masse totale (Zeitun, 2011).

2.3.3.2.2 Tissus de soutien

Les tissus de soutien, tel que le sclérenchyme, sont situés à proximité de l'épiderme. Ils sont caractérisés par une forte résistance mécanique, obtenue souvent par des parois épaisses (cellulose) mais aussi par un fort taux de lignine. Parmi ces tissus, le sclérenchyme est très allongé et constitué de cellules mortes enrichies en lignine. Ce sont notamment ces tissus qui assurent la rigidité à la plante et qui sont appelés « fibres ». Le sclérenchyme est un tissu important, puisqu'il représente 25 à 27% du volume de la paille de blé pour 55% de la masse totale (Zeitun, 2011).

2.3.3.2.3 Tissus superficiels

Les tissus superficiels regroupent l'ensemble des tissus exposés à l'environnement extérieur. Pour les céréales, l'épiderme est le tissu superficiel le plus fréquent (Sun, 2010). Il est composé de cellules très ordonnées et imprégnées d'une couche cireuse, la cuticule, qui confère une imperméabilité tout en permettant des échanges gazeux avec l'atmosphère. Ces tissus sont également caractérisés par de fortes teneurs en silice. Cette couche superficielle représente 5 à 7% du volume de la paille de blé pour 15% de la masse totale (Zeitun, 2011).

2.3.3.3 Hétérogénéités ultrastructurelles : cytologie végétale

En plus des hétérogénéités induites par les différents tissus végétaux, la structure des cellules végétales qui les composent est aussi hétérogène. L'étude de la cytologie végétale présente un schéma type des cellules matures dont la spécialisation est dépendante de la cellule considérée. Ainsi, la paroi squelettique d'une cellule végétale est composée d'une série de couches allant de l'extérieur de la cellule jusqu'à la vacuole centrale : la lamelle moyenne (ML), la paroi primaire (P), la paroi secondaire (S), puis la paroi tertiaire (T) (Figure 2-21).

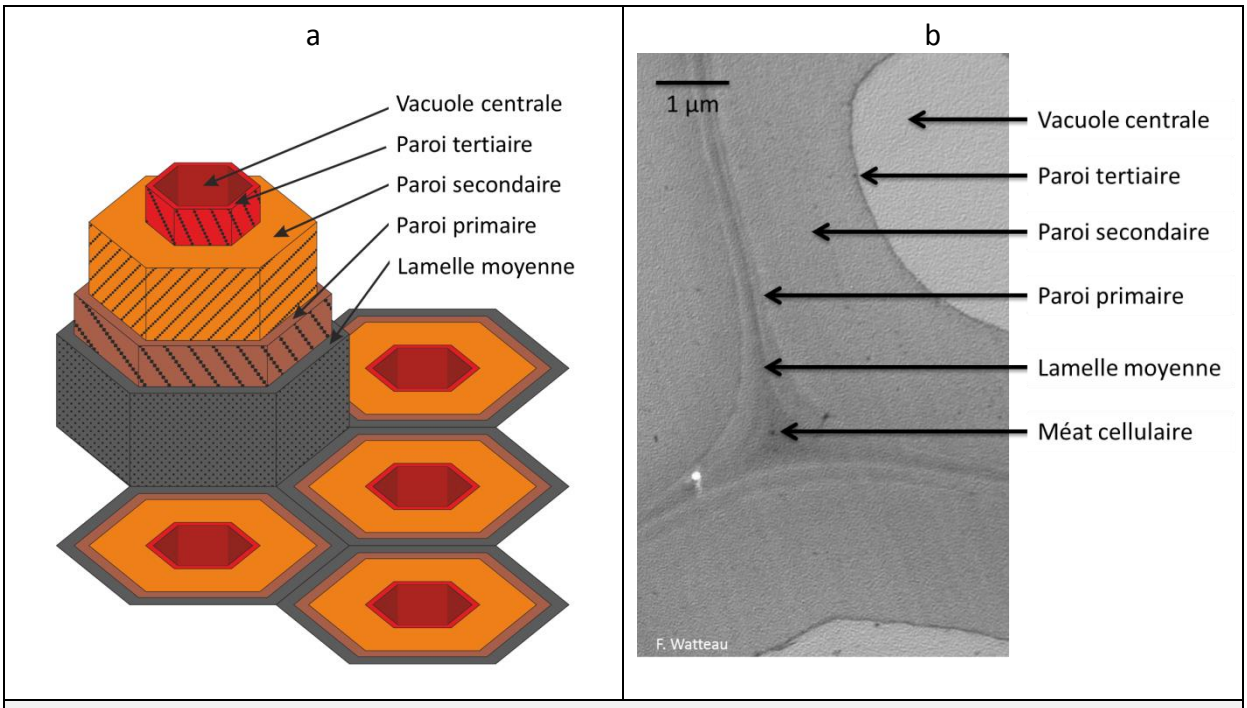


Figure 2-21 : Structure des parois cellulaires des pailles de céréales.
(a) Schéma conceptuel des parois végétales. (b) Observation microscopique des parois cellulaires de la paille de blé.

La lamelle moyenne (ML) est une couche fine composée du résidu de la membrane primitive des jeunes cellules formées juste après la mitose cellulaire (Tableau 2-3). Elle sert principalement de liant entre les cellules végétales adjacentes (Figure 2-21) et est normalement exempte de cellulose (Tableau 2-4). Cette paroi est principalement composée

d'hémicelluloses et de pectines. L'intersection de plusieurs cellules est constituée d'une zone commune de composition proche des lamelles moyennes appelée méat cellulaire.

La paroi primaire est fine et flexible (Tableau 2-3). Elle est produite très tôt dans le processus de croissance. Pour assurer une élasticité pour la croissance de la cellule, elle est composée d'hémicelluloses et de pectines associées à de la cellulose (Tableau 2-4) (Nougarède *et al.*, 1969). Les fibrilles de cellulose des parois primaires sont notamment orientées dans la direction de la croissance cellulaire (Reece *et al.*, 2011). La paroi primaire est très fortement liée à la lamelle moyenne.

		Méat	Lamelle moyenne	Paroi primaire	Paroi secondaire		
					S1	S2	S3
Epaisseur en mm	Min	Nd.	0,1		0,1	1,8	0,15
	Max	Nd.	0,2		0,3	2,5	0,3
Fraction volumique		5,4%	9,3%		83,5%		

Tableau 2-3 : Abondance des parois cellulaires dans les cellules de la paille de blé. D'après (Sun, 2010)

La paroi secondaire se développe vers l'intérieur de la cellule mature, après que la croissance de la cellule soit terminée. Cette paroi est particulièrement développée chez les pailles, puisque son rôle est d'assurer la rigidification des cellules. Ainsi, dans les tissus de support, elle peut représenter plus de 80% du volume des parois (Tableau 2-3). De par son rôle, elle est composée de cellulose plutôt cristalline et de lignines (Tableau 2-4). La paroi secondaire peut-être composée de trois sous-couches: assise externe (S1), assise médiane (S2) et assise interne (S3). Ces trois couches varient entre elle notamment par l'orientation des microfibrilles de cellulose et de leurs épaisseurs (Tableau 2-3). En particulier, l'assise médiane peut atteindre 2,5 µm et représenter 70 à 90% de la paroi cellulaire. Cette assise est sujette à des fortes variations (épaisseur notamment) en fonction du stade de croissance, de la saison, de l'organe ou du tissu considéré.

Les cellules végétales sont interconnectées par des ponctuations membranaires. Ces structures de la paroi végétale de quelques micromètres se forment sur une ouverture traversant la paroi cellulaire : le plasmodesme. Le plasmodesme est un canal traversant toutes les couches de la paroi cellulaire dont le diamètre est d'environ 20 à 40 nm (Reece *et al.*, 2011). Ces ouvertures permettent le passage des fluides nutritifs de la plantes (sèves et eau) d'une cellule à une autre (Nougarède *et al.*, 1969).

La lignification des parois cellulaires survient après l'arrêt de la croissance de la cellule. L'imprégnation par des lignines est donc tardive et a lieu principalement dans les tissus de soutiens (Nougarède *et al.*, 1969). Les lignines imprègnent la quasi-totalité des espaces interfibrillaires des membranes primaires et secondaires. Ce dépôt s'accompagne de

cellulose et substances pectiques. Les parois primaires des tissus de soutien sont très lignifiées suggérant que, dans ces tissus, le taux de lignines augmente avec l'éloignement de la vacuole centrale. Pourtant, malgré une plus faible abondance dans les parois secondaires, 60 à 80% des lignines des pailles de blé sont présentes dans les parois secondaires puisque ce tissu représente environ 80% du volume des pailles (Tableau 2-3) (Sun, 2010).

	Lamelle moyenne	Paroi primaire	Paroi secondaire			Paroi tertiaire
			S1	S2	S3	
Tissus de synthèse	$H\ Ps$	$H\ C\ Ps$	Absence			Absence
Tissus de support	$L\ H\ Ps$	$L\ H\ Ps$	$C\ H\ L$			H
Tissus épidermiques	$L\ H\ Ps$ S	$L\ H\ Ps$ S	$C\ H\ L\ S$			$H\ S$

Tableau 2-4 : Composition des parois cellulaires des principaux tissus.
Les constituants biochimiques des parois cellulaires sont classés par ordre d'abondance. C, Cellulose ; H, Hémicelluloses ; L, Lignines ; S, Silices ; Ps, Substance pectique. (Nougarède *et al.*, 1969; Kuhad, Singh & Eriksson, 1997; Reece *et al.*, 2011)

2.3.3.4 Taille des particules

D'un point de vue théorique, la propagation des micro-organismes au sein des cellules végétales se fait par de petits orifices situés au niveau des parois cellulaire reliant les cellules : les ponctuations cellulaires (section 2.3.3.3) (Nougarède *et al.*, 1969). Or, cette progression de ponctuations en ponctuations est lente et diminue considérablement l'accessibilité de certaines cellules par un ralentissement de processus de colonisation de la biomasse lignocellulosique. Le broyage idéal d'un substrat lignocellulosique consiste donc en une coupe transversale de chaque cellule végétale de sorte à offrir au moins un passage rapide vers l'intérieur de chaque cellule (Wilson & Mertens, 1995). La longueur d'une fibre de paille de blé semble comprise entre 500 et 3000 µm (Sun, 2010). Ainsi, un broyage au millimètre peut statistiquement offrir au moins un accès à l'intérieur de chaque cellule végétale (Figure 2-22). De plus, puisque la cellule végétale est composée d'une succession de parois de compositions différentes, le découpage des cellules dans leur largeur semble théoriquement intéressant pour rendre accessible chacune des parois cellulaires. Cette coupe longitudinale permettrait d'éviter aux micro-organismes de devoir dégrader des parois moins digestes pour atteindre les parois les plus biodégradables. Le diamètre moyen d'une cellule de paille de blé est compris en 10 et 25 µm (Sun, 2010). Par conséquent des tailles de particules de l'ordre de la dizaine de micromètre permettraient de favoriser l'accessibilité des différentes parois cellulaires (Figure 2-22).

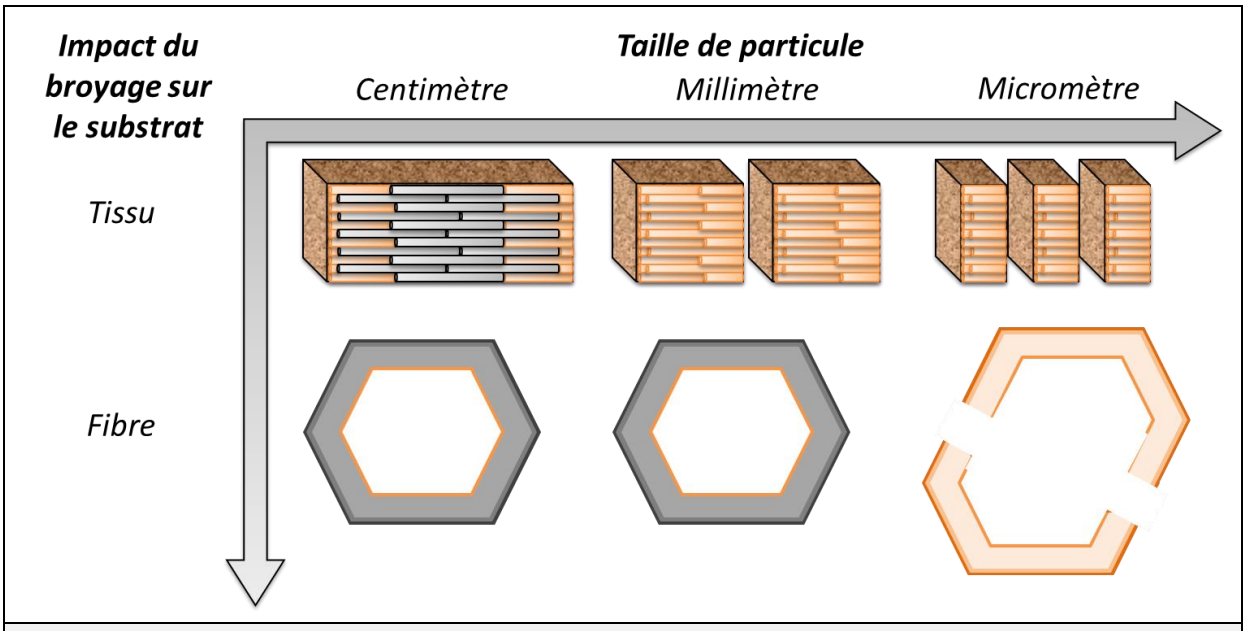


Figure 2-22 : Broyage optimal vis à vis de la longueur du substrat lignocellulosique.
Les structures difficilement accessibles sont représentées en gris. La réduction de taille des particules permet d'augmenter l'accessibilité des cellules végétales voir même des différentes parois dans le cas d'un broyage à l'échelle du micromètre. (Wilson & Mertens, 1995)

2.3.4 DÉGRADATION DE LA LIGNOCELLULOSE

2.3.4.1.1 Dégradation de la lignocellulose par les micro-organismes

La composition des tissus et des cellules végétales limite la dégradation de la matière organique par les micro-organismes. Les résistances induites par l'épiderme (cuticule cireuse), la rigidité des tissus ligneux, la structure tridimensionnelle des cellules végétales et l'imbrication des polymères sont des facteurs limitant la dégradation par une diminution de l'accessibilité du substrat (Chang & Holtzapple, 2000). En méthanisation, la dégradation est assurée par des micro-organismes anaérobies. Leur mode d'attaque, leur déplacement et leur position sur le substrat ne sont que partiellement étudiés dans la littérature.

Ainsi, la grande complexité des écosystèmes anaérobies et la structure tridimensionnelle des supports lignocellulosiques limitent techniquement les études microscopiques. Par conséquent, l'approche généralement retenue à ce jour en digestion anaérobie est l'usage de substrats lignocellulosiques simples tels que le papier ou la cellulose pure (Ahn *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 2005; Song, Clarke & Blackall, 2005). Finalement, les données les plus précises concernent la dégradation de la lignocellulose dans le rumen (Engels & Schuurmans, 1992; Wilson & Mertens, 1995), les composts (Dresboll & Thorupkristensen, 2005; Dresbøll & Magid, 2006) ou les sols (Bertrand *et al.*, 2006). Ainsi, même si ces systèmes sont différents de la digestion anaérobie par voie sèche, il est possible d'identifier des tendances dans l'attaque de la lignocellulose.

A l'échelle des tissus végétaux, les micro-organismes ont tendance à dégrader le substrat de l'intérieur de la plante vers l'extérieur (Akin & Burdick, 1975). La raison principale réside dans la forte résistance de l'épiderme aux attaques microbiennes et à leur fixation. Une fois à l'intérieur des tissus, les micro-organismes dégradent les cellules de la vacuole vers la lamelle moyenne (Wilson & Mertens, 1995). Selon le niveau de lignification des parois qu'ils rencontrent, cette attaque est plus ou moins efficace. Par conséquent, les tissus peu lignifiés et situés vers l'intérieur des plantes tels que les tissus des parenchymes (Heyne, 1987) sont plus facilement dégradés. Le déplacement des micro-organismes d'une cellule végétale à une autre est réalisé par les zones fragiles du tissus lignocellulosique. Ainsi, les micro-organismes utilisent des cassures des parois végétales ou des ponctuations membranaires pour progresser (Nougarède *et al.*, 1969).

2.3.4.1.2 Attaque enzymatique

La dégradation des résidus lignocellulosiques par les micro-organismes semble fonctionner principalement par voie enzymatique (Lequart *et al.*, 2000). Cette attaque permet de solubiliser les polymères constitutifs de la lignocellulose, selon les capacités du micro-organisme considéré. Il est possible d'identifier plusieurs catégories d'enzymes selon leurs actions sur la cellulose, les hémicelluloses ou les lignines.

La cellulose est généralement dégradée grâce à une synergie entre trois types d'enzymes : endoglucanases, exoglucanases et 1,4-β-glucosidases (Kuhad *et al.*, 1997). Ces enzymes hydrolysent la cellulose par découpage des liaisons polymériques pour former des cellobioses (dimères de glucose) puis du glucose. Ces activités enzymatiques sont retrouvées dans de nombreux environnements aérobies et anaérobies. Ainsi, de très nombreux micro-organismes présentent des activités cellulolytiques (bactéries anaérobies et aérobies, champignons, actinomycètes…) (Kuhad *et al.*, 1997). Les hémicelluloses ont une structure plus complexe et nécessitent des enzymes différentes. La paille étant composée majoritairement de xylose et d'arabinose, des enzymes spécifiques doivent être émises pour leur dépolymérisation. Une activité hydrolytique des xyloses semble prédominante (β-1,4-Xylanases et β-1,4-Xylosidases), suivi d'une action sur les arabinoses (α-Arabinosidases) (Kuhad *et al.*, 1997). L'activité hémicellulolytique est quant à elle réalisée par une large variété de micro-organismes comprenant des bactéries et des champignons aérobies et anaérobies. De plus, l'action des enzymes spécifiques aux pectines, les pectinases, peut favoriser l'hydrolyse des hémicelluloses. Enfin, les enzymes impliquées dans la dégradation des lignines (laccases, lignines peroxydases, manganèse-dépendent peroxydases…) fonctionnent par oxydation des composés phénoliques (Kuhad *et al.*, 1997). Les lignines semblent dégradées principalement par des enzymes émises par des champignons lignolytiques aérobies.

En voie sèche, la concentration apparente en substrats et enzymes est augmentée par une faible dilution. L'hydrolyse de la matière organique peut alors être facilitée par une réduction de distance (Modenbach & Nokes, 2013). Cependant, l'activité hydrolytique

concentre également les produits potentiellement inhibiteurs des enzymes pouvant ainsi réduire les performances globales. Pour cette raison, des performances généralement plus faibles sont observés lors de l'augmentation de la teneur en matières sèches dans des conditions de voie sèche (Kristensen, 2008).

2.3.5 BIODÉGRADABILITÉ DES PAILLES DE BLÉ

Les hétérogénéités des résidus lignocellulosiques induisent des effets sur leur biodégradabilité. Présenter une composition moyenne de la paille de blé semble donc difficile tant la variabilité est grande. En particulier, les proportions des polymères du tissu lignocellulosique (lignines, cellulose cristalline), leur imbrication, la succession des parois cellulaires de composition différente, la structure des tissus ou la présence de certains composés limitant l'accessibilité (cires et silices) induisent des effets sur l'homogénéité micro et macroscopique des végétaux. Tous ces facteurs sont susceptibles de varier en fonction : des variétés, du stade de croissance, des conditions environnementales durant le développement, du mode de récolte et des conditions de stockage (Antongiovanni & Sargentini, 1991). Pour toutes ces raisons, les caractérisations des pailles de blé relevées dans la littérature sont sujettes à d'importantes variations. Pourtant, la caractérisation des substrats lignocellulosiques est un enjeu important dans l'évaluation et l'amélioration de leur biodégradation (Monlau *et al.*, 2013).

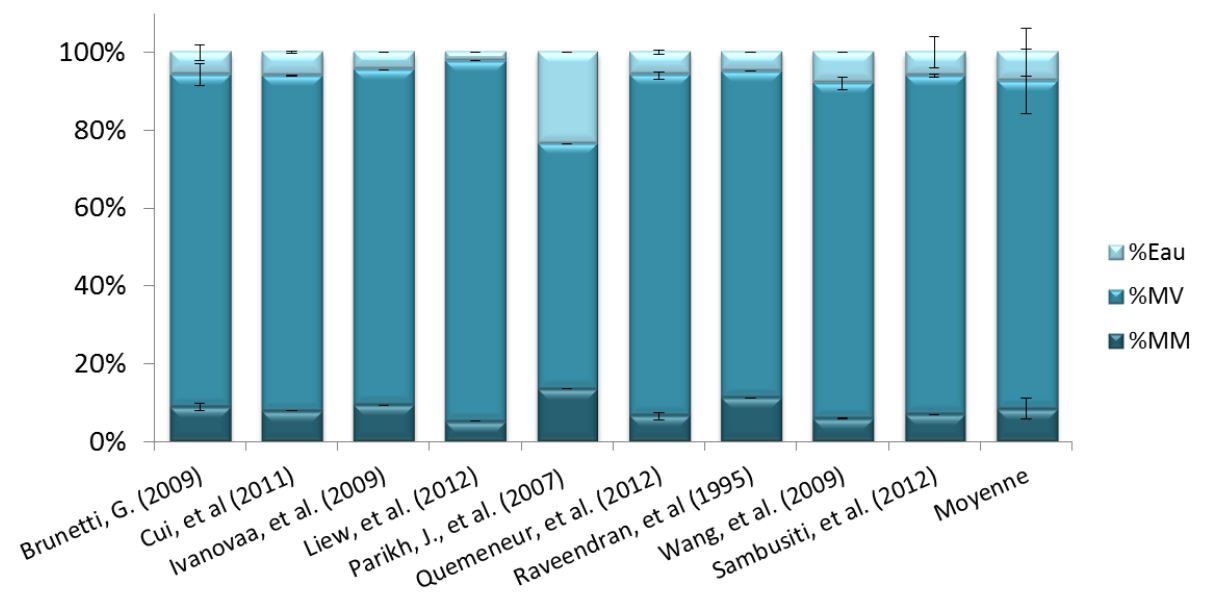


Figure 2-23 : Teneurs en eau, en matières organiques et en matières minérales des pailles de blé.

(Raveendran, Ganesh & Khilar, 1995; Parikh, Channiwala & Ghosal, 2007; Brunetti *et al.*, 2009; Ivanova, Rákhely & Kovács, 2009; Wang *et al.*, 2009; Cui, Shi & Li, 2011; Liew, Shi & Li, 2012; Quéméneur *et al.*, 2012a; Sambusiti *et al.*, 2013)

2.3.5.1 Caractérisation

2.3.5.1.1 Teneur en matières sèches, organiques et minérales

Les pailles sont souvent récoltées lors de la maturité du grain. Cette récolte a lieu à un stade où la plante est relativement sèche. Ensuite, les pailles sont généralement assemblées en bottes et séchées naturellement avant usage. Par conséquent, les pailles utilisées (9 occurrences retenues dans la littérature, Figure 2-23) sont généralement sèches avec des teneurs en matières sèches (MS) supérieures à 90%. Puisqu'elles sont composées essentiellement de la fraction lignocellulosique de la plante, les pailles sont essentiellement composées de matières organiques (assimilées aux matières volatiles notées MV). Ainsi, les pailles sont composées d'environ 8% de matières minérales (MM). Ces matières minérales sont composées dans un ordre décroissant d'abondance de : Si, K, Na, Ca, Cl, Al, P, S, Mg, Fe (Demirbas, 2004).

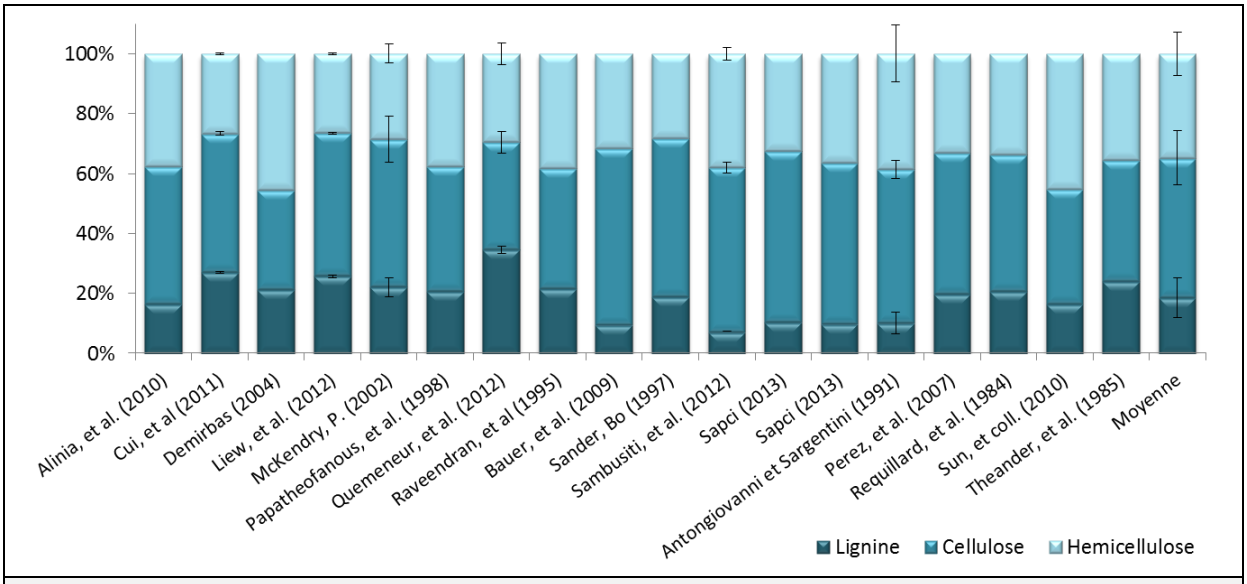


Figure 2-24 : Proportion de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines dans les pailles de blé. (Requillart, 1984; Antongiovanni & Sargentini, 1991; Raveendran *et al.*, 1995; Sander, 1997; McKendry, 2002; Demirbas, 2004; Pérez & González, 2007; Bauer *et al.*, 2009; Alinia *et al.*, 2010; Sun, 2010; Cui *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2012; Quéméneur *et al.*, 2012a; Sambusiti *et al.*, 2013; Sapci, 2013)

2.3.5.1.2 Structure lignocellulosique

La paille est un résidu de type CHL (cellulose, hémicelluloses et lignines) (Vassilev *et al.*, 2012). La cellulose est donc majoritaire (environs 38% de la masse sèche), suivie des hémicelluloses (28%) et enfin des lignines (15%). Le reste est constitué d'une fraction soluble (12%, composée de pectines, sucres libres, cires) et de cendres (7%). La proportion précise de chaque polymère semble néanmoins varier fortement selon les études. Ceci s'explique par les différences entre les méthodes de mesure des sucres pariétaux (Van Soest ou hydrolyse acide) (Hatfield & Fukushima, 2005) ou de la phase soluble (extraction à l'eau, au détergeant ou aux solvants organiques) (Sun, 2010). En normalisant ces données en fonction

de la proportion de cellulose, d'hémicelluloses et des lignines, d'importantes variations de proportions sont observées (18 occurrences retenues, Figure 2-24). Ces différences sont imputables aux teneurs en lignines qui augmentent grandement avec l'âge de la plante et qui sont distribuées de manière hétérogène entre les organes.

Les carbohydrates constitutifs des pailles de blé sont majoritairement liés à la cellulose (glucose) et aux hémicelluloses (xylose et arabinose) (6 occurrences retenues, Figure 2-25). Le glucose étant le monomère principal de la cellulose, sa concentration est généralement très proche de celle de la cellulose (36% de glucose contre 38% de cellulose), indiquant qu'il est possible d'estimer la cellulose d'un substrat par sa composition en glucose. Un ratio de 1,11, défini par les formules stœchiométriques, est d'ailleurs décrit dans la littérature (Monlau *et al.*, 2012b). De même, le xylose et l'arabinose forment la majorité des hémicelluloses. La concentration des monomères et polymères est ainsi relativement proche (20% de xylose et 2% d'arabinose contre 28% d'hémicelluloses) avec un ratio théorique de 1,13. La composition en sucres informe sur le degré de substitution des hémicelluloses (rapport arabinose/xylose). Ainsi, ce ratio (9%) est relativement faible vis-à-vis d'autres substrats lignocellulosiques (Brown *et al.*, 2012), ce qui indique une bonne digestibilité des hémicelluloses de paille de blé (Chesson *et al.*, 1983; Bertrand *et al.*, 2006).

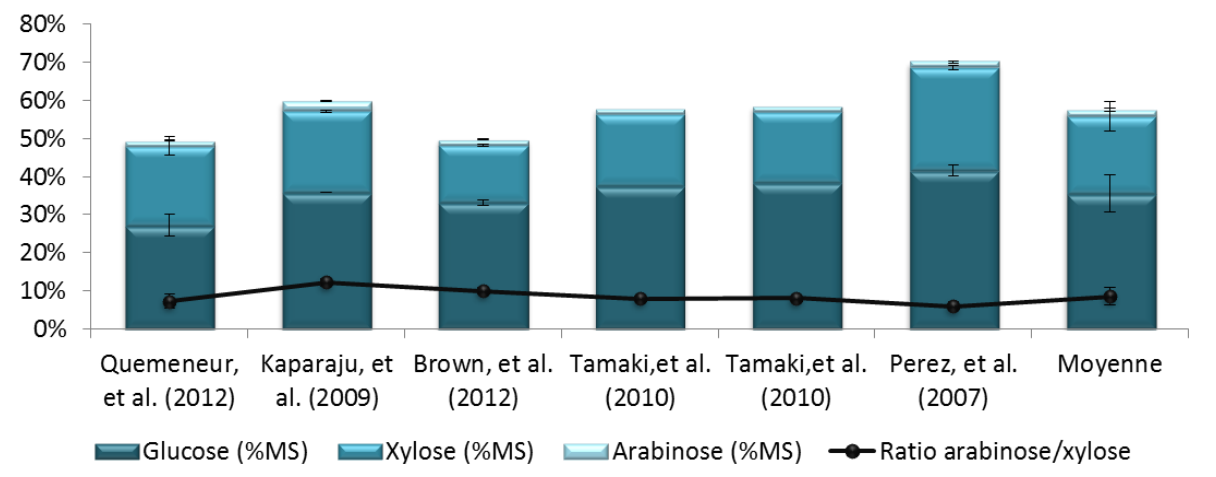


Figure 2-25 : Composition en sucres des pailles de blé et degré de substitution des hémicelluloses.

(Pérez & González, 2007; Kaparaju *et al.*, 2009; Tamaki & Mazza, 2010; Brown *et al.*, 2012; Quéméneur *et al.*, 2012a)

2.3.5.1.3 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire permet de mesure finement la proportion des éléments majoritaires de la paille de blé (8 occurrences retenues, Tableau 2-5). Les éléments principaux de la fraction organique des pailles sont : le carbone (47,2%), l'hydrogène (0,6%), l'oxygène (36,7%), l'azote (5,5%) et le souffre (0,1%). La digestion anaérobie d'un substrat dépend fortement de leur proportion de carbone et d'azote. Ces proportions sont déterminantes pour éviter des carences lors de la digestion anaérobie et pour permettre le

retour au sol des digestats. Le ratio C/N retenu pour décrire cet équilibre est généralement recommandé aux alentours de 30 (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Or, la paille de blé présente un déficit en azote (ratio C/N moyen de 84). De plus, ces données permettent d'évaluer théoriquement le potentiel énergétique des pailles.

Références	%C	%H	%O	%N	%S	Pouvoir calorifique supérieur (PCS) (MJ.kg)	BMP Buswell ($Nml.g_{MS}^{-1}$)
(Monties, Ln & Chimie, 1984)	53,6%	1,1%	31,4%	5,2%	0,0%	16,36	536
(Raveendran *et al.*, 1995)	47,5%	0,1%	35,8%	5,4%	Nd.	16,97	469
(McKendry, 2002)	48,5%	0,3%	33,9%	5,5%	0,1%	23,47	488
(Grotkjaer, Dam-Johansen & Jensen, 2003)	44,0%	0,7%	40,0%	5,9%	0,1%	20,52	436
(Demirbas, 2004)	41,8%	0,7%	35,5%	5,5%	Nd.	Nd.	420
(Parikh *et al.*, 2007)	45,5%	Nd	34,1%	5,1%	Nd.	18,08	448
(Sapci, 2013)	48,4%	0,6%	41,6%	5,7%	Nd.	17,92	466
(Sapci, 2013)	47,9%	0,5%	41,6%	5,8%	Nd.	17,89	464
Moyenne	**47,2%**	**0,6%**	**36,7%**	**5,5%**	**0,1%**	**18,75**	**466**

Tableau 2-5 : Composition élémentaire de la paille de blé et prédiction du potentiel méthane.

2.3.5.2 Potentiel énergétique

2.3.5.2.1 Pouvoir calorifique et potentiel méthane théorique

Il est possible, à partir d'une analyse élémentaire d'un substrat, de connaitre le volume de méthane théorique pouvant être produit. Cette prédiction du potentiel méthane théorique a été proposée dans les années 30 par les travaux conduits par Buswell (Buswell & Hatfiled, 1936) étendue pour tenir compte de l'azote et souffre :

$$C_nH_aO_b+\left(n-\frac{a}{4}-\frac{b}{2}\right)H_2O\rightarrow\left(\frac{n}{2}-\frac{a}{8}+\frac{b}{4}\right)CO_2+\left(\frac{n}{2}+\frac{a}{8}-\frac{b}{4}\right)CH_4 \qquad \text{Équation 19}$$

$$C_nH_aO_bN_cS_d+\left(n-\frac{a}{4}-\frac{b}{2}+3\frac{c}{4}+\frac{d}{2}\right)H_2O \qquad \text{Équation 20}$$
$$\rightarrow\left(\frac{n}{2}-\frac{a}{8}+\frac{b}{4}+3\frac{c}{8}+\frac{d}{4}\right)CO_2+\left(\frac{n}{2}+\frac{a}{8}-\frac{b}{4}-3\frac{c}{8}-\frac{d}{4}\right)CH_4+cNH_3+dH_2S$$

L'analyse élémentaire de la paille informe également sur le pouvoir calorifique supérieur (PCS) des pailles de blé. Le PCS est la quantité d'énergie théoriquement dégagée

par une combustion complète de la matière organique. Elle est déterminée par la formule de Dulong (Demirbas, 2004) :

$$PCS = 33{,}5 \times \%C + 142{,}3 \times \%H - 15{,}4 \times \%O - 14{,}5 \times \%N \qquad \text{Équation 21}$$

La conversion en unités d'énergie s'effectue en prenant en compte le PCS du méthane (38,3 $MJ.m^{-3}$). Ainsi, si la paille présente un potentiel de combustion de 18,7 $MJ.kg^{-1}$ (Équation 20), le méthane ne représente qu'un potentiel de 17,9 $MJ.kg^{-1}$ (Équation 21). Le bilan énergétique brut est donc défavorable à la production de méthane dans l'éventualité de sa combustion. L'intérêt de la méthanisation des pailles réside dans le fait que le méthane est un vecteur énergétique stockable et transportable, pouvant par exemple être injecté dans les réseaux de gaz (EEA, 2013) ou utilisé comme carburant (Ademe, 2008). De plus, le retour au sol des digestats participe à la diminution de l'utilisation d'engrais (azotés notamment) et au piégeage du carbone dans le sol (Alexandre *et al.*, 2012).

La production de méthane théorique n'est jamais atteinte, notamment en raison de la présence de composés non biodégradables (les lignines par exemple) ou non accessibles (cellulose cristalline) ou encore de la croissance microbienne. Par conséquent, les potentiels méthanes théoriques calculés par la formule de Buswell sont toujours supérieurs aux rendements réels. Néanmoins, le potentiel théorique permet d'estimer la biodégradabilité du substrat (Buffière *et al.*, 2008) (Potentiel méthane obtenu/potentiel théorique).

Enfin, l'analyse élémentaire permet également d'estimer la demande chimique en oxygène (DCO) des échantillons solides. La DCO est un moyen simple et rapide d'estimer la biodégradabilité d'un substrat, puisque d'un point de vue théorique, 350 $NmL_{CH4}.g_{DCO}^{-1}$ au maximum peuvent être produits. La DCO d'un solide est particulièrement difficile à obtenir par les méthodes expérimentales standards (Buffière *et al.*, 2008) et l'analyse élémentaire peut combler ce vide (Équation 22). A partir de l'analyse élémentaire de la littérature, il est possible déterminer la DCO de la paille de blé à 1,3±0,1 $g.g_{MS}^{-1}$.

$$C_nH_aO_b + \left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right)O_2 \rightarrow nCO_2 + \frac{a}{2}H_2O \qquad \text{Équation 22}$$

2.3.5.2.2 Les potentiels méthanes

Le potentiel méthane d'un substrat lié à une dégradation biologique est évalué par le test BMP (Biochemical Methane Potential). Ce test consiste à dégrader un échantillon et de suivre la production de méthane associée (Angelidaki *et al.*, 2009). Pour se faire, une masse précise d'échantillon est ajoutée à un milieu réactionnel saturé en eau, contenant une quantité importante de micro-organismes et suffisamment de nutriments, d'oligoéléments et de tampon. L'inoculation déterminée par le ratio S/X (MV de substrat/ MV inoculum) est un facteur très important (aux alentours de 0,5 $g_S.g_X^{-1}$). Bien que largement utilisé, aucune norme ou standardisation de ce protocole n'a été réalisée. Ainsi, une étude de 2009 (Raposo *et al.*, 2009) a clairement montré les limites de ce test par la grande disparité des valeurs

mesurées sur un même échantillon dans plusieurs laboratoires. Par conséquent, en plus des variabilités propres aux substrats (espèce, stade de croissance, stockage) (Rincón *et al.*, 2010; Sapci, 2013), la valeur du BMP est fortement influencée par les limites de la méthode, telles que la qualité de l'inoculum ou la méthode de mesure des gaz. Il n'est donc pas étonnant de constater de très grandes variations du potentiel méthane dans la littérature attribuables à la fois à des problèmes méthodologiques et à la variabilité du substrat.

Néanmoins, la moyenne pour les pailles de blé se situent aux alentours 225 $NmL.g_{MS}^{-1}$ en conditions mésophiles (13 occurrences retenues, Figure 2-26) et 265 $NmL.g_{MS}^{-1}$ en conditions thermophiles. Ces données sont toutefois très variables, comme en témoigne le fort coefficient de variation observé en condition mésophile (23%). En thermophile, le faible nombre d'études ne permet pas de mettre en évidence cette variabilité, même si elle est toujours présente. Cependant, en comparant la valeur moyenne des BMP expérimentaux aux BMP théoriques, il est possible d'estimer que la biodégradabilité de la paille de blé est inférieure à 50% (Buffière *et al.*, 2008).

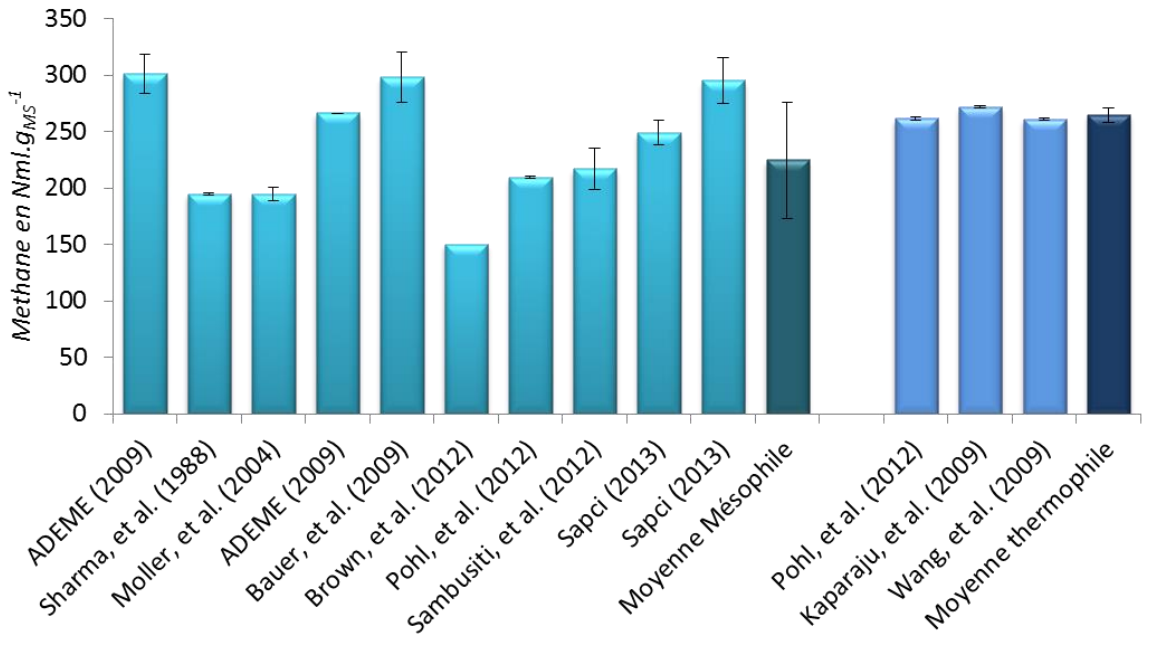


Figure 2-26 : Potentiels méthane des pailles de blé issus de la littérature.
(Sharma *et al.*, 1988; Ademe, 2009; Bauer *et al.*, 2009; Kaparaju *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2012; Pohl *et al.*, 2012; Sambusiti *et al.*, 2013; Sapci, 2013)

2.3.5.2.3 Les potentiels hydrogènes

Un test a été élaboré afin de mesurer la production d'hydrogène potentielle à partir d'un substrat : le test BHP (Biochemical Hydrogen Potential). Ce test repose sur le même concept que le potentiel méthane, à savoir mesurer la production d'hydrogène d'un substrat en conditions non limitantes. Le suivi de la réaction est par contre plus délicat puisque, contrairement au méthane qui s'accumule dans le ciel gazeux, l'hydrogène est un

intermédiaire qui peut être consommé au cours de la réaction. Néanmoins, du point de vu méthodologique, la principale différence réside dans l'inoculum pour lequel l'activité méthanogène doit être inhibée par des prétraitements thermiques ou chimiques (Guo *et al.*, 2010). Ce prétraitement repose sur les capacités de sporulation des micro-organismes producteurs d'hydrogène (bactéries), contrairement aux micro-organismes méthanogènes (*Archaea*) qui ne résistent pas à ces conditions.

	Moyenne	Ecart-type	Min	Max	Nombre
%MS (% paille brut)	**93%**	6%	77%	98%	9
%MV (% paille brut)	**84%**	8%	63%	93%	9
%MM (% paille brut)	**8%**	3%	5%	14%	9
Phase soluble (%MS)	**12%**	5%	5%	18%	7
Hémicelluloses (%MS)	**28%**	6%	18%	39%	18
Cellulose (%MS)	**38%**	7%	27%	53%	18
Lignines (%MS)	**15%**	5%	7%	26%	18
Cendres (%MS)	**7%**	3%	4%	11%	6
Glucose (%MS)	**36%**	5%	27%	42%	6
Xylose (%MS)	**20%**	4%	15%	27%	6
Arabinose (%MS)	**2%**	0%	2%	3%	6
Ara/Xyl	**9%**	2%	6%	12%	6
%C	**47%**	4%	42%	54%	8
%H	**6%**	0%	5%	6%	8
%O	**33%**	12%	4%	42%	8
%N	**1%**	0%	0%	1%	7
%S	**0%**	0%	0%	0%	3
DCO équivalente ($g.g_{MS}^{-1}$)	**1,37**	0,16	1,20	1,69	8
BMP théorique ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	**479,0**	57,4	419,9	593,0	8
PCS ($MJ.kg_{MS}^{-1}$)	**18,7**	2,5	16,4	23,5	8
BMP $_{35°C}$ ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	**225**	51	150	301	10
BMP $_{55°C}$ ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	**265**	6	261	272	3
BHP ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	**5**	4	0,5	9,5	3

Tableau 2-6 : Caractérisation moyenne des pailles de blé décrites dans la littérature. Les données utilisées correspondent aux références mentionnée dans Figure 2-23, Figure 2-24, Figure 2-25, Figure 2-26 et Tableau 2-5

La production d'hydrogène est essentiellement corrélée à la quantité de sucres solubles (Monlau *et al.*, 2012b). Or, la paille de blé en possède nativement une faible proportion (≈ 12%). La majorité des études utilisant la paille de blé comme modèle applique donc des prétraitements dans le but d'augmenter la solubilisation des sucres (explosion à la

vapeur, hydrolyse acide, prétraitements alcalins, enzymatiques…) (Guo *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Ainsi, seulement 3 études mesurant les BHP de la paille de blé ont été identifiée (Fan *et al.*, 2006; Nasirian *et al.*, 2011; Quéméneur *et al.*, 2012a). Dans ces études, le BHP de la paille est compris entre 1 et 10 $NmL.g_{MS}^{-1}$. Cependant, en conditions hyper-thermophiles (70°C), une étude a mesuré un potentiel hydrogène supérieur à 45 $NmL.g_{MS}^{-1}$ (Ivanova *et al.*, 2009). Cette augmentation notable peut-être due à une hydrolyse du substrat accrue par simple action thermique (Hendriks & Zeeman, 2009).

2.3.5.3 Caractérisation moyenne des pailles de blé

En synthétisant les données de la littérature, il est possible de présenter le profil type d'une paille de blé (Tableau 2-6).

D'une manière générale, malgré une richesse en composés organiques, la biodégradabilité de la paille est relativement faible, ce qui s'explique par la complexité d'un substrat où les fractions biodégradables ne sont pas toujours accessibles aux micro-organismes.

2.3.6 CONCLUSIONS SUR L'INFLUENCE DU SUBSTRAT

La valorisation de la biomasse lignocellulosique est largement étudiée dans la littérature, pour la production de biomolécules (Martins *et al.*, 2011), de biocarburants (Sun & Cheng, 2002) ou de biogaz (Monlau *et al.*, 2013). Dans cette optique, les bioprocédés occupent une place de choix en raison de leur souplesse. En effet, les variations de composition et de structure des substrats sont des freins importants pour une standardisation des procédés (McKean & Jacobs, 1997). La digestion anaérobie supporte cette variabilité grâce aux larges communautés microbiennes impliquées. En effet, ces micro-organismes peuvent mettre en œuvre une large gamme de moyens d'actions pour dégrader efficacement la matrice lignocellulosique (Kuhad *et al.*, 1997). Cependant, si l'action des micro-organismes est prédominante dans la biodégradation des substrats, relativement peu d'études semblent orientées vers la compréhension de la dégradation de la structure lignocellulosique par les micro-organismes (Clarke & Alibardi, 2010).

2.4 PARAMÈTRES CLÉS DE LA DIGESTION SÈCHE

Le dimensionnement et le fonctionnement des digesteurs par voie sèche sont principalement conduits à partir de connaissances empiriques. Ces enseignements proviennent en grande partie du savoir-faire développé autour de la méthanisation humide et des décharges d'ordure ménagères. Ceci a été facilité par le fait que les connaissances générales de la méthanisation sont identiques en voie sèche et n'ont donc pas nécessité d'études spécifiques. Ainsi, la digestion sèche est identique à la voie humide en ce qui concerne l'existence de :

- Quatre étapes conduisant à la transformation du substrat en méthane : hydrolyse, acidogenèse, acétogenèse et méthanogenèse.
- Diverses communautés microbiennes produisant des molécules simultanément substrats et inhibiteurs d'autres micro-organismes.
- Deux gammes de température : mésophile (35°C) et thermophile (55°C).
- Une hydrolyse des solides considérée comme limitante.

Ces connaissances générales ont été aisément prises en compte lors du développement des technologies par voie sèche. Cependant, la réduction de la teneur en eau induit des caractéristiques propres à ces procédés : inoculation, agitation, rhéologie, hétérogénéités, caractéristique du substrat (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Ce sont des variables ajustables pour conduire la réaction biologique en fonction des objectifs fixés (performances épuratoires, production de biogaz, stabilité du digesteur). Ces paramètres ont été ajustés empiriquement à l'échelle industrielle. Afin de pouvoir optimiser la méthanisation par voie sèche, il est nécessaire d'apprécier les effets des principaux paramètres de procédés sur l'écosystème de méthanisation sèche.

2.4.1 CONFIGURATION

2.4.1.1 Fonctionnement discontinu

Le fonctionnement batch consiste en un chargement initial du substrat avec une quantité d'inoculum plus ou moins importante. Le digesteur est scellé et le biogaz est produit selon un rythme proche des courbes de croissance microbienne : phase de latence, phase d'accélération, phase exponentielle, phase de ralentissement puis phase stationnaire. La production de biogaz n'est donc pas constante (Figure 2-27-A), et fait face à un pic de production durant la phase exponentielle, survenant quelques jours après le démarrage (Figure 2-27-B). Ensuite, la production de biogaz est ralentie mais peut continuer durant un temps assez long. Ainsi, selon si l'objectif fixé est le taux de dégradation ou la production de biogaz l'opérateur peut être amené à moduler le temps de réaction. Les réacteurs discontinus présentent donc une dynamique globale dont l'avancement dépend grandement des paramètres opératoires.

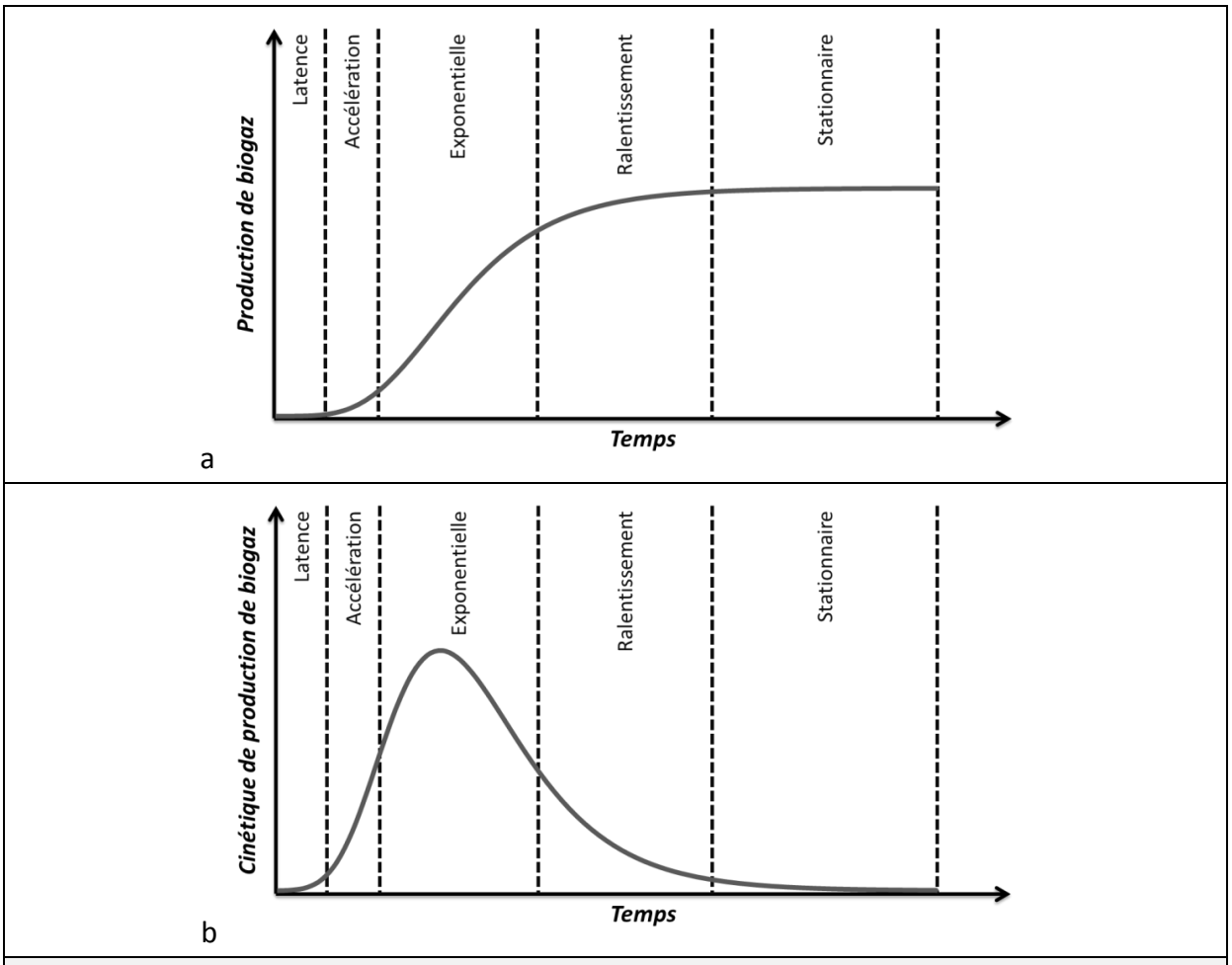


Figure 2-27 : Production de biogaz en fonctionnement discontinu.
(a) Production de biogaz cumulée. (b) Vitesse de production de biogaz au cours du temps.

2.4.1.2 Fonctionnement continu

La configuration continue consiste à introduire de manière régulière le substrat (ou un mélange digestat/substrat) tout en soutirant une partie du digestat. Cette configuration permet de maintenir une production de biogaz régulière. Les variables à fixer en continu sont le temps de séjour associé à la charge appliquée. Ces deux paramètres sont des notions respectivement proches de la durée de la réaction et du ratio S/X en fonctionnement discontinu.

Les digesteurs voies sèches en mode continu fonctionnent tous sur une configuration de type piston. Cette configuration est induite par les difficultés de mélange d'un milieu pâteux et hétérogène (Garcia-Bernet *et al.*, 2011a), où l'agitation est surtout employée pour la progression du digestat dans le réacteur. Par définition, les configurations de type piston sont assimilables à une succession de réacteur discontinus dont l'avancement de la réaction dépend de la localisation au sein du digesteur (Figure 2-28). Ce type de configuration présente donc un système globalement à l'équilibre avec des dynamiques ponctuelles selon le positionnement au sein du milieu. Par conséquent, l'étude des digesteurs discontinus

permet d'apporter des informations sur le fonctionnement local dans les digesteurs continus.

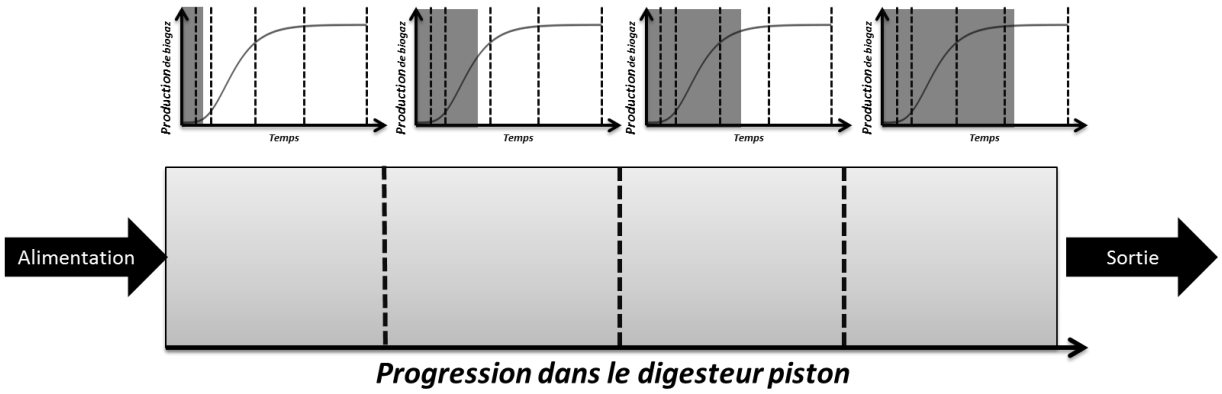


Figure 2-28 : Fonctionnement d'un réacteur de type piston.

2.4.2 INOCULATION

L'écosystème de la digestion anaérobie est composé d'une large variété de populations microbiennes. Le maintien d'un écosystème efficace pour la dégradation du substrat, grâce à l'équilibre entre les différents communautés microbiennes (hydrolytique, acidogène, acétogène et méthanogène) est un enjeu important lors de la conduite d'un digesteur. Il est impossible de piloter directement le développement des micro-organismes durant la réaction biologique. Ce contrôle est réalisé indirectement par les paramètres de procédés. L'inoculation est par conséquent une étape critique pour la mise en place de l'écosystème et donc le démarrage des digesteurs. Cette étape est cruciale en digestion sèche en raison de l'absence ou de la faible efficacité d'agitation qui limitent les contacts entre substrats et micro-organismes. De plus, si l'apport de micro-organismes semble être une condition pour assurer un démarrage rapide et correct de la méthanisation, l'inoculation ne peut pas être prise en compte uniquement en tant que variable quantitative. En effet, certains autres paramètres peuvent agir sur les effets de l'inoculation: nature du substrat, teneur en matières sèches, origine et diversité microbienne de l'inoculum vis-à-vis su substrat (Forster-Carneiro *et al.*, 2007, 2008).

2.4.2.1 Quantité d'inoculum

La quantité d'inoculum est le levier principal pour le démarrage d'un digesteur. Fondamentalement, l'inoculation doit apporter suffisamment de micro-organismes pour assurer une dégradation rapide du substrat et un bon rendement biogaz. L'inoculation est généralement quantifiée par le rapport entre les quantités de substrat (S) et de micro-organismes (X). Ce ratio S/X est généralement exprimé en matières volatiles. Une inoculation forte implique un S/X faible et permet d'éviter tous risques d'acidification. En effet, dans les systèmes dysfonctionnels, une accumulation d'acides gras volatils et une chute de pH sont

observées (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). L'accumulation d'AGV provient de l'hydrolyse et de l'acidogenèse du substrat et traduit un déséquilibre entre le flux produit par les micro-organismes hydrolytiques et acidogènes et la quantité transformée par l'acétogenèse et la méthanogenèse. Ce déséquilibre peut être contré par une forte inoculation qui apporte suffisamment de micro-organismes acétogènes et méthanogènes.

Si dans l'industrie, des inoculations massives sont retenues (S/X < 0.5), des taux plus faibles sont généralement employé à l'échelle du laboratoire (S/X de 2 à 6 en MV) (Brown *et al.*, 2012; Liew *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Ceci suggère donc que l'inoculation nécessite une optimisation à l'échelle industrielle. L'optimisation de l'inoculation est souhaitable d'un point de vue économique puisqu'une inoculation forte réduit la quantité de substrat introduite dans les digesteurs. Dans cette optique, certains auteurs concluent à une inefficacité de la digestion anaérobie pour des ratios S/X supérieur à 4 (Cui *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2012). Cependant, lorsque le procédé est convenablement maitrisé, il est possible d'obtenir une digestion anaérobie efficace pour des taux d'inoculation très faible (S/X > 10 en MV) (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Cette faible inoculation conduit à un allongement du temps de la réaction (> 300 jours) et n'est donc pas applicable à grande échelle. Cependant, cette très faible inoculation permet de mettre le système en conditions de croissance microbienne (responsable de l'allongement des cinétiques), et de sélectionner les micro-organismes les plus adaptés aux conditions environnementales (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Par conséquent, les faibles taux d'inoculation concernent surtout les études fondamentales associées à la digestion sèche.

2.4.2.2 Composition de l'inoculum

Le flux de métabolites issus de l'hydrolyse et de l'acidogenèse doit être consommé par des micro-organismes acétogènes et méthanogènes possédant de faibles taux de croissance par rapport aux micro-organismes hydrolytiques. Or, certains inocula de digestion sèche peuvent présenter une faible proportion en communautés méthanogènes (< 5%) (Li *et al.*, 2013). Cette faible abondance peut expliquer les déséquilibres entre hydrolyse et méthanogenèse, observés lors des démarrage des digesteurs secs (Shi *et al.*, 2013). Par conséquent, l'usage d'un inoculum ayant une trop faible proportion de micro-organismes acétogènes ou méthanogènes peut conduire à un déséquilibre des flores de la digestion anaérobie. A contrario, les inocula principalement composés de populations hydrolytiques et acidogènes sont privilégiés dans les fermenteurs produisant de l'hydrogène ou de l'éthanol par exemple (Fang, Li & Zhang, 2006). Dans ces cas particuliers, l'inoculum peut être prétraité (thermiquement ou chimiquement) pour inhiber les micro-organismes méthanogènes notamment (Guo *et al.*, 2010). Enfin, en cas d'une concentration suffisante en méthanogènes, l'hydrolyse du substrat devient l'étape limitant la cinétique globale de la réaction (Philippidis & Smith, 1995; Vavilin *et al.*, 2008). L'activité hydrolytique est en effet fortement dépendante des espèces présentes et de leur capacité à dégrader certains types

de substrat (Fdéz-Güelfo *et al.*, 2010). La sélection d'un inoculum préalablement adapté à la dégradation du substrat est donc un critère important.

2.4.3 TEMPÉRATURE

La température de fonctionnement d'un digesteur impacte grandement les performances et la stabilité du procédé. Quatre gammes de température de méthanisation sont classiquement décrites : hyperthermophile (≈ 70°C), thermophile (≈ 55°C), mésophile (≈ 37°C) et psychrophile (< 25 °C) (FAL, 2007; Jha *et al.*, 2011). Néanmoins, les conditions mésophile et thermophile sont principalement employées en digestion anaérobie (Figure 2-29). Ces gammes de température correspondent aux températures optimales de fonctionnement et de croissance des micro-organismes. Ainsi, ce paramètre conditionne les micro-organismes (Shi *et al.*, 2013). Le passage d'une température à une autre est possible d'un point vue biologique (de la Rubia *et al.*, 2005), mais cette opération est longue puisqu'elle consiste en un changement des communautés microbiennes. Par conséquent, le choix des températures de fonctionnement est généralement fixé dès l'étape de dimensionnement.

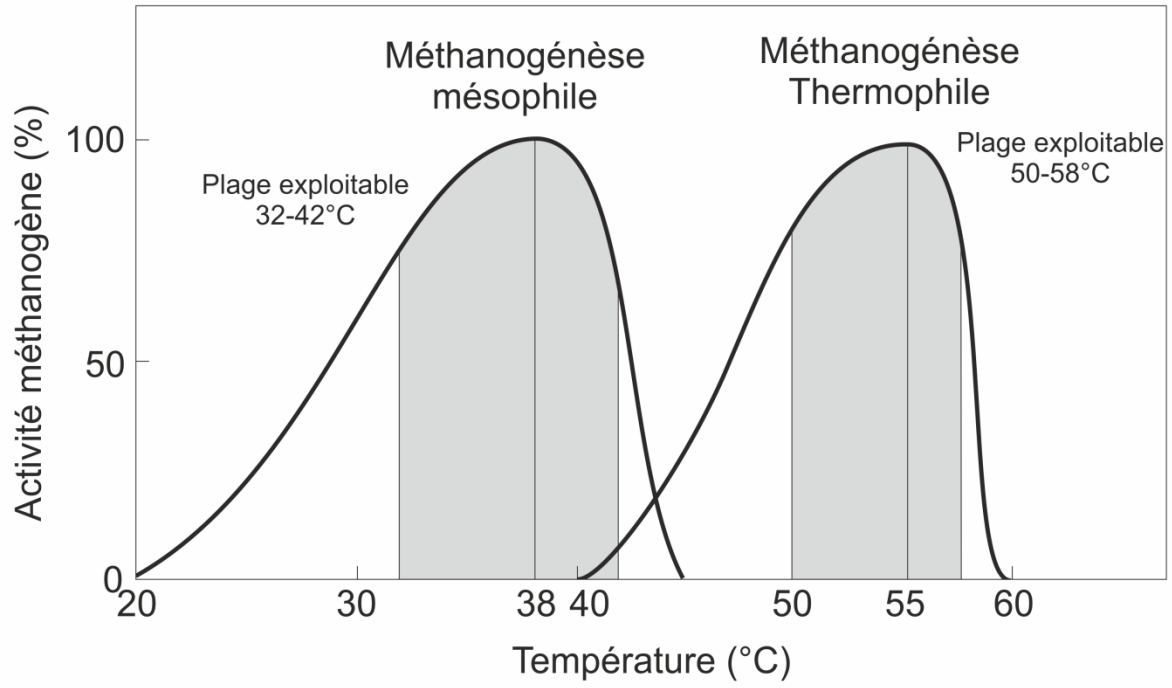


Figure 2-29 : Gamme de températures exploitables en méthanisation.
(FAL, 2007)

Outre un effet sur la biomasse, la température a des effets abiotiques liés notamment à la déstructuration et la fragilisation du substrat. Ainsi, il a été noté qu'une température importante facilite la solubilisation des sucres et conduit ainsi à de meilleurs rendements d'hydrolyse (Converti *et al.*, 1999). Par conséquent, les températures élevées favorisent la dégradation des résidus solides et donc le rendement méthane (Pohl *et al.*, 2012). Cette

augmentation est d'ailleurs très sensible sur les étapes d'acétogenèses (fermentations), où de meilleurs rendement de production d'hydrogène sont régulièrement observés (Shin, Youn & Kim, 2004; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005a). Cependant, les digesteurs thermophiles sont réputés pour être plus sensibles que les digesteurs mésophiles (Lianhua *et al.*, 2010).

2.4.4 PRÉTRAITEMENTS DES SUBSTRATS

La caractérisation des substrats informe sur leur biodégradabilité potentielle. Cependant, en raison de la structure complexe des substrats lignocellulosiques, cette source de matières organiques n'est pas totalement accessible. En particulier, la structure et l'imbrication fine des polymères, l'empilement de parois de compositions différentes, la faible surface spécifique du substrat, limitent la dégradation de la lignocellulose (Chang & Holtzapple, 2000). Pour améliorer les rendements, plusieurs prétraitements sont envisageables (Hendriks & Zeeman, 2009; Monlau *et al.*, 2013). Leurs objectifs peuvent être la pré-hydrolyse du substrat, l'augmentation des surfaces accessibles ou la solubilisation d'un des polymères de la lignocellulose.

2.4.4.1 Catégories de prétraitements

Le choix des prétraitements dépend fortement des objectifs fixés, des contraintes de procédés et du cadre économique (Tableau 2-7).

Prétraitements	Avantages	Inconvénients	Effets
Thermiques	Rapidité Efficacité	Très énergivore Saturation en eau	Augmentation de la surface spécifique Solubilisation des sucres
Chimiques	Efficacité	Gestion des déchets Saturation en eau	Solubilisation des sucres
Biologiques	Peu énergivore	Lenteur Contrôle	Solubilisation des sucres
Mécaniques	Simplicité	Très énergivore	Augmentation de la surface spécifique

Tableau 2-7: Applicabilité des prétraitements de la biomasse lignocellulosique pour la voie sèche.

Les prétraitements thermiques consistent à utiliser des températures élevés (> 100°C) et des pressions parfois importantes dans le but d'exploser le tissu lignocellulosique et d'amorcer la solubilisation des sucres. Le substrat offre ainsi une plus grande surface accessible aux micro-organismes et à leurs enzymes. Ces prétraitements sont cependant coûteux en énergie et conduisent à une saturation en eau des biomasses (Jackowiak *et al.*, 2011; Sapci, 2013).

Les prétraitements chimiques consistent à employer des composés chimiques dans le but de solubiliser ou de déstructurer une fraction précise de la matrice lignocellulosique. Parmi ceux-ci, il est possible de citer les prétraitements : acides, alcalins ou oxydatifs (Monlau *et al.*, 2013). Cependant, l'emploi de composés chimiques potentiellement inhibiteurs de la digestion anaérobie impose des étapes de récupération coûteuse. Les traitements poussés semblent également capables de libérer des composés inhibiteurs pour les micro-organismes contenus dans la matrice lignocellulosique (Barakat *et al.*, 2012; Quéméneur *et al.*, 2012b; Jönsson, Alriksson & Nilvebrant, 2013). Enfin, la saturation d'eau nécessaire pour une action des composés chimiques limite l'applicabilité de ces prétraitements pour la digestion sèche puisqu'une séparation liquide/solide devrait être envisagée.

Les prétraitements biologiques consistent à employer des micro-organismes ou des enzymes capables de pré-hydrolyser la lignocellulose. Le choix de l'enzyme ou des micro-organismes dépend grandement de l'objectif fixé : solubilisation des lignines, des hémicelluloses, de la cellulose, des pectines… Appliquer ces procédés à la digestion sèche semble possible d'un point de vue théorique (Zhang *et al.*, 2007b; Kristensen, 2008). Cependant, des études doivent être menées pour comprendre le comportement des biomasses microbiennes et de leurs enzymes en voie sèche (Modenbach & Nokes, 2013).

2.4.4.2 Prétraitements mécaniques

Les prétraitements mécaniques (broyage) permettent de diminuer la granulométrie de la biomasse lignocellulosique sans ajout d'eau. Ils sont par conséquent facilement applicables en digestion sèche. La réduction granulométrique permet principalement d'augmenter la surface accessible du substrat, diminuer la cristallinité de la cellulose, d'augmenter la biodisponibilité des polymères aux micro-organismes (Barakat, de Vries & Rouau, 2013) et d'augmenter la phase soluble (Izumi *et al.*, 2010; Tamaki & Mazza, 2010). Plusieurs catégories de broyage existent en fonction de la granulométrie cible (Silva, 2011): les broyages grossiers (du centimètre au millimètre), les broyages fins (jusqu'à 100 µm) et les broyages ultrafins (jusqu'à 10 µm).

Dans la littérature, une large gamme de taille de particules a été étudiée allant du centimètre au micromètre (Figure 2-30). Puisque les broyages fins augmentent la phase soluble, qui est constituée de composés pariétaux facilement métabolisables par les micro-organismes, ils permettent d'augmenter les cinétiques de dégradation (Sharma *et al.*, 1988; Mshandete *et al.*, 2006; Lindmark *et al.*, 2012). Les broyages fins sont donc considérés comme favorables pour la digestion anaérobie même si ils sont limités par leur consommation énergétique (Barakat *et al.*, 2013). En voie humide, l'effet positif du broyage est parfois pondéré par l'hydrolyse trop rapide du substrat pouvant conduire à une acidification du milieu réactionnel (Izumi *et al.*, 2010). En voie sèche, les produits de l'hydrolyse peuvent avoir une action inhibitrice accrue en raison d'une plus forte concentration apparente. Par conséquent, si les broyages fins en voie humide favorisent

globalement la réaction, la voie sèche pourrait avoir des seuils de tolérance plus faibles à une réduction granulométrique des substrats. Une autre conséquence des broyages, réside dans leur impact sur la capacité de rétention d'eau (phase soluble) (Mongeau & Brassard, 1982; Sangnark & Noomhorm, 2003) et de la rhéologie du milieu (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Ainsi, les transferts de matières dans le milieu sont impactés par la taille des particules, accentuant les risques d'inhibitions (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012).

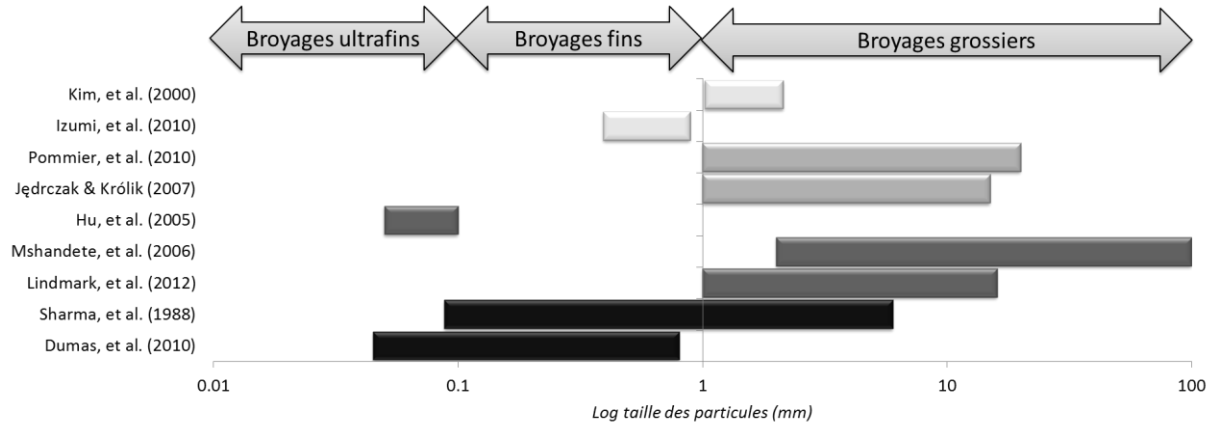


Figure 2-30 : Gamme de tailles de particules étudiées dans la littérature.
La couleur des histogramme indique la proximité de la nature du substrats avec la paille de blé : noir pour paille de blé, gris foncé pour des substrats lignocellulosiques, gris moyen pour des papiers ou cartons, gris clair pour des déchets organiques solides. (Sharma *et al.*, 1988; Kim, Kim & Hyun, 2000; Hu, Yu & Zhu, 2005; Mshandete *et al.*, 2006; Jędrczak & Królik, 2007; Dumas *et al.*, 2010; Izumi *et al.*, 2010; Pommier, Llamas & Lefebvre, 2010; Lindmark *et al.*, 2012)

2.4.5 TENEUR EN MATIÈRES SÈCHES

La teneur en matières sèches est un paramètre majeur dans la conduite de la digestion anaérobie des solides. La teneur en MS induit des effets en termes de concentrations locales, d'hétérogénéités, de rhéologie du milieu, de transfert de matières ou de progression de la biomasse microbienne sur le support.

2.4.5.1 Définitions

Malgré quelques études spécifiques (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b; Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), les bornes de la digestion par voie sèche ne sont pas décrites précisément. Si la méthanisation est clairement considérée comme liquide en dessous de 15% de MS (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; De Baere & Mattheeuws, 2010), la limite de 20% est souvent admise comme limite basse de la digestion par voie sèche (Vandevivere *et al.*, 2002; Bolzonella *et al.*, 2003). Cette borne laisse donc une zone intermédiaire comprise en 15 et 20% MS, qualifiée de digestion « semi-sèche ». Cette définition ne fait pas consensus et certains auteurs supposent que la digestion semi-sèche est comprise entre 10 et 20% MS (Bolzonella *et al.*, 2003; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b), tandis que d'autres ne

considèrent tout simplement pas cette limite définissant la digestion sèche à partir de 15% de MS (Brown *et al.*, 2012). De plus, aucune limite supérieure pour la digestion par voie sèche n'a été décrite. Le développement industriel a conduit à la création d'unités fonctionnant majoritairement entre 20 et 30% MS et jusqu'à 40% MS pour certaines technologies (Guendouz *et al.*, 2010; Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Ces différences peuvent être attribuées à la nature du substrat. La dégradation de la matière organique en biogaz conduit à une diminution de la teneur en MS (Brown, 2012). Cette diminution n'est pas pondérée par la quantité d'eau consommée par les réactions biologiques (hydrolyse) ou entrainée par l'évacuation du biogaz. Entre l'entrée et la sortie des digesteurs, cette diminution de la teneur en matières sèches peut atteindre 15 à 20% (Shi *et al.*, 2013). Ainsi, une humidification progressive du milieu est généralement observée au cours de la dégradation (Brown *et al.*, 2012).

2.4.5.2 Etat de l'eau dans le système

A l'échelle industrielle, le caractère pompable ou manipulable d'un milieu définit la nature du procédé (sec ou humide) (Vandevivere *et al.*, 2002). Cette définition, purement empirique, traduit l'importance de la rhéologie du milieu (Figure 2-31). Très peu d'études se sont penchées sur la rhéologie des digestats, principalement en raison de difficultés de mesure pour des milieux hétérogènes et complexes (Battistoni *et al.*, 1993; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b). Ces études ont conclu que la rhéologie des milieux dépend bien sûr de la teneur en eau globale, mais également de l'origine et des caractéristiques du substrat. Ces auteurs suggèrent que le comportement de l'eau dans la matrice est un facteur prépondérant pour la compréhension des mécanismes physiques. Par conséquent, la quantité globale d'eau mais aussi son comportement (disponibilité, état, hétérogénéité) doivent ainsi être pris en compte dans la caractérisation des digestats par voie sèche.

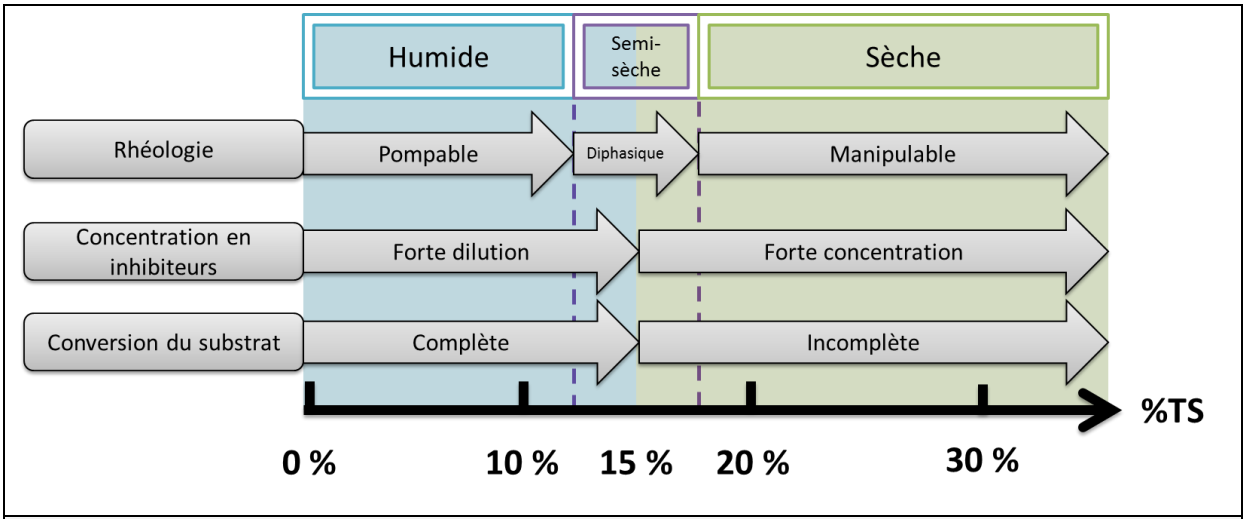


Figure 2-31 : Bornes de la digestion anaérobie par voie sèche.

L'interaction de l'eau avec la matière conduit à une compartimentation de l'eau. Ainsi, une matrice humidifiée se lie progressivement à l'eau par d'hydratation chimique, vicinales

puis capillaires jusqu'à saturation. A saturation, l'eau excédentaire se trouve sous forme libre. Les frontières entre eau d'hydratation, eau vicinale, eau capillaire et eau libre peuvent être mesurées par plusieurs types de tests dont les isothermes de sorption et les courbes de séchage (Lagoudaki & Demertzis, 1993; Garcia-Bernet *et al.*, 2011a). Ces mesures définissent les seuils de compartimentation de l'eau en termes de quantité d'eau. Une étude a montré que la dégradation microbienne n'impacte que la fraction capillaire de l'eau liée (Garcia-Bernet *et al.*, 2011a). Or la limite entre l'eau libre et l'eau capillaire (liée) est caractérisée par la teneur en eau critique (Wc) obtenue à partir d'une courbe de séchage. Cette limite traduit la teneur en matières sèches au-delà de laquelle l'eau est liée au milieu (Pommier *et al.*, 2007), diminuant ainsi sa propagation dans le milieu .

2.4.5.3 Effets de la diminution de la phase liquide

Outre les modifications de la rhéologie des milieux, l'augmentation de la teneur en matières sèches conduit à une diminution quantitative de la phase « liquide ». Ceci a des conséquences non négligeables sur les concentrations en composés inhibiteurs, substrats et micro-organismes contenus dans la phase liquide. Même au sein de systèmes fonctionnels, les concentrations apparentes en acides gras volatils peuvent ainsi être très supérieures (Staley *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013) aux seuils d'inhibitions généralement décrits (Siegert & Banks, 2005; Van Ginkel & Logan, 2005). Ceci peut sans doute s'expliquer par l'augmentation de l'alcalinité du milieu (effet de concentration) ou encore par une stratification des micro-organismes au sein des milieux permettant de protéger la flore la plus sensible (Martin, 2001). La diminution de la phase liquide induit aussi une augmentation des hétérogénéités du milieu. Ainsi, des diminutions de performances peuvent être dues à l'accessibilité réduite du substrat aux micro-organismes (Pommier *et al.*, 2007). Les transferts de matières dans les milieux secs peuvent devenir limitants (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Bollon *et al.*, 2013). Toutefois, il a été montré que cette baisse de performances est plus liée à des phénomènes physiques que biologiques (Le Hyaric *et al.*, 2012). En effet, la faible quantité d'eau permet de réduire considérablement les distances entre la solubilisation du substrat et sa consommation. Les transferts de métabolites entre compartiments microbiens sont ainsi plus rapides (Wang & Chen, 2009). La forte complexité des phénomènes influant la digestion sèche ainsi que leurs interactions, font qu'à ce jour le fonctionnement de la méthanisation sèche n'est pas clairement maitrisé.

2.4.6 AGITATION

L'agitation est un paramètre difficilement pris en compte dans la littérature. Ainsi, les quelques études portant sur l'effet de l'agitation présentent seulement des éléments qualitatifs de comparaison : agitation continue, discontinue, forte, douce, milieu non agité… Une « forte » agitation semble défavorable à la digestion anaérobie (Stroot *et al.*, 2001). De plus, une agitation « douce » semble préférable à une absence d'agitation (Ghanimeh, El Fadel & Saikaly, 2012). En effet, l'agitation permet de favoriser les échanges liquide-gaz

favorisant ainsi les transferts de matière. Des résultats similaires ont également montré qu'une agitation faible était préférable à une agitation forte ou une absence d'agitation (Gómez *et al.*, 2006). La diminution des performances pour les agitation fortes est attribuée à une déstructuration des compartiments microbiens (McMahon *et al.*, 2001; Vavilin & Angelidaki, 2005). Ainsi, les micro-organismes peuvent se trouver en contact avec des inhibiteurs dont ils étaient protégés grâce à la structuration des communautés (Martin, 2001). Ces observations indiquent qu'une agitation optimale doit permettre la maximisation des transferts (diffusion, liquide-gaz) tout en préservant la structuration des micro-organismes. Enfin, l'absence d'agitation lors du démarrage des digesteurs secs semble favoriser le démarrage des digesteurs (Karim *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que les effets de l'agitation dépendent de l'avancement de la réaction.

2.4.7 ALCALINITÉ ET PH

L'alcalinité, parfois appelée pouvoir tampon du milieu, caractérise la capacité des milieux à maintenir le pH dans une plage optimale malgré la présence d'acides produits lors de la digestion anaérobie. Les pH acides sont connus pour favoriser les formes dissociées des acides gras volatils et de l'ammoniac, qui sont connus pour présenter des pouvoirs inhibiteurs plus importants (Amani *et al.*, 2010). Ainsi, le pH doit être maintenu proche de la neutralité entre 6.5 et 8.5 (Moletta, 2008). En digestion anaérobie, l'alcalinité traduit le pouvoir tampon du milieu et dépend de la concentration en ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-), composés acides (AGV) et ammoniac. En voie sèche, ce pouvoir tampon est fondamental puisque les concentrations apparentes en acides gras volatils dans le milieu peuvent atteindre des valeurs très élevées (Shi *et al.*, 2013). Une forte alcalinité empêche alors le système de s'acidifier. A contrario, en fermentation, des pH acides sont privilégiés et des alcalinités faibles sont alors recherchées (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b), puisque les micro-organismes consommateurs d'hydrogène sont inhibés dans de telles conditions.

2.4.8 MAINTIEN DE L'ANAÉROBIOSE

La phase gazeuse d'un digesteur anaérobie en cours de fonctionnement peut être composée de méthane et de dioxyde de carbone issus de la fermentation, d'hydrogène notamment en cas d'acidification du digesteur, d'hydrogène sulfuré pour les déchets soufrés, d'azote provenant de la mise en condition du ciel gazeux durant le démarrage et d'oxygène en cas de fuites ou lors du démarrage. Bien que les micro-organismes hydrolytiques soit aérobies facultatifs, la majorité des micro-organismes de la digestion anaérobie sont anaérobies stricts. Le maintien de conditions d'anaérobiose est donc important pour le fonctionnement de la méthanogenèse. Or, les gaz du ciel gazeux sont en équilibre avec la phase liquide en vertu de la loi de Henry (Équation 23).

$$P_i = x_i \times H_i \qquad \text{Équation 23}$$

P_i est la pression partielle du gaz dans la phase gazeuse ; x_i est la fraction molaire du gaz en solution ; H_i est la constante de Henry pour le gaz considéré

Ces équilibres sont importants notamment dans le cas des gaz inhibiteurs (H_2 et H_2S). Pour éviter une inhibition, un entrainement de ces gaz par un renouvellement du ciel gazeux peut permettre de diminuer la concentration en gaz dissous. Ce concept fut même appliqué pour le contrôle des réacteurs fermentaires (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012). Cependant, le ciel gazeux d'un digesteur est fortement composé de dioxyde de carbone (Fdéz-Güelfo *et al.*, 2010), particulièrement au début de la réaction (Fernández, Porrier & Chamy, 2001). Le renouvellement du ciel gazeux peut conduire à une mise en équilibre du dioxyde de carbone en provenance de la phase liquide. Ce dégagement de CO_2 modifie le pouvoir tampon du milieu et peut donc impacter son pH (Brouckaert *et al.*, 2013). Ceci augmente les risques d'acidification des digesteurs.

Par conséquent les prélèvements de milieu réactionnel en cours de fermentation sont limités par la modification majeure de la composition de la phase gazeuse qu'ils produisent. Cette contrainte limite fortement le développement de la recherche fondamentale sur la dynamique de digestion par voie sèche. En effet, la quasi-totalité des études s'est focalisée sur une comparaison entre l'état initial et final des digesteurs (Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012; Liew *et al.*, 2012). Des approches alternatives ont été proposées par certains auteurs : sacrifice des milieux réactionnels en arrêtant la réaction en cours de dégradation (Staley *et al.*, 2011), ralentissement des réactions par une faible inoculation (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), conduite de digesteurs continus (Fdéz-Güelfo *et al.*, 2010). La simple ouverture des digesteurs a été réalisée par certains auteurs mais sans considération de l'effet d'une perturbation du ciel gazeux sur le milieu réactionnel (Shi *et al.*, 2013).

2.5 CONCLUSIONS DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le développement de la digestion sèche découle des connaissances acquises à partir des procédés humides, mais manque singulièrement de connaissances fondamentales dédiées. A l'échelle industrielle, différentes solutions techniques ont donc été développées de manière empirique laissant des marges d'optimisation importantes. La méthanisation par voie sèche nécessite donc des connaissances spécifiques pour comprendre les phénomènes mis en jeu dans le but d'optimiser le procédé dans son ensemble. Du fait d'une concentration plus importante en solide, plusieurs phénomènes complexes et non maitrisés influencent les performances de dégradation. A la lecture de la littérature, il est possible d'identifier trois ensembles de phénomènes :

- Les phénomènes liés aux micro-organismes, sur lesquels peu d'actions directes peuvent être menées.
- Les phénomènes liés à la nature des substrats, dépendant principalement de l'implantation des installations.
- Les phénomènes liés aux paramètres de procédés, sur lesquelles la conduite ou le design des procédés représentent les variables de contrôle principales.

Ainsi, seuls des paramètres liés au procédé semblent ajustables pour piloter la dégradation. Cependant, la réduction des teneurs en eau complexifie grandement la réponse du système face à ces ajustements. Par exemple, l'augmentation des teneurs en matières sèches dans le procédé permet de réduire le volume des digesteurs et favorise donc à priori le bilan économique (Vandevivere *et al.*, 2002). Par contre, cette diminution conduit à une diminution de la phase soluble impactant les hétérogénéités du milieu (Staley *et al.*, 2011), l'accessibilité du substrat (Pommier *et al.*, 2007), la rhéologie (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b) ou encore les transferts de matières (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Bollon *et al.*, 2013). La quantité de phase soluble est dépendante de la capacité de rétention d'eau du substrat et donc de sa nature mais aussi de la taille des particules (Mongeau & Brassard, 1982; Sangnark & Noomhorm, 2003). De plus, la diminution des teneurs en eau conduit à une augmentation des concentrations en substrat ou inhibiteurs qui impactent grandement l'environnement immédiat des micro-organismes (Martin, 2001; Staley *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). Il y a alors un risque de baisse de rendement, de ralentissement des cinétiques voir d'acidification des digesteurs. Enfin, puisque le système tend vers une humidification progressive du milieu au cours de la dégradation (Brown *et al.*, 2012), tous ces phénomènes évoluent au fil de la dynamique de la réaction.

3 OBJECTIFS ET DEROULEMENT DE LA THESE

3.1 CONTEXTE

L'étude fondamentale des digesteurs par voie sèche est fortement limitée par la complexité des phénomènes biologiques, chimiques et physiques en interaction. Ce constat explique sans doute le manque de connaissances scientifiques sur la digestion par voie sèche. Ainsi, la dégradation du substrat par les micro-organismes est peu comprise, alors que cette relation est au cœur du procédé. Cette compréhension est un des verrous principaux pour l'optimisation de la digestion sèche puisque les paramètres des procédés sont ajustés pour favoriser une dégradation efficace du substrat lignocellulosique. Ainsi, du point de vu de l'écosystème microbien, les paramètres de procédés (température, teneur en eau, broyage…) sont des contraintes environnementales qui impactent la compétition entre espèces microbiennes ou leur mode de dégradation du substrat (ex : complexité structurelle) (Figure 3-1). Par conséquent, la digestion sèche est un processus où l'interaction centrale entre la biomasse microbienne et le support biodégradable est dépendante des paramètres de procédés.

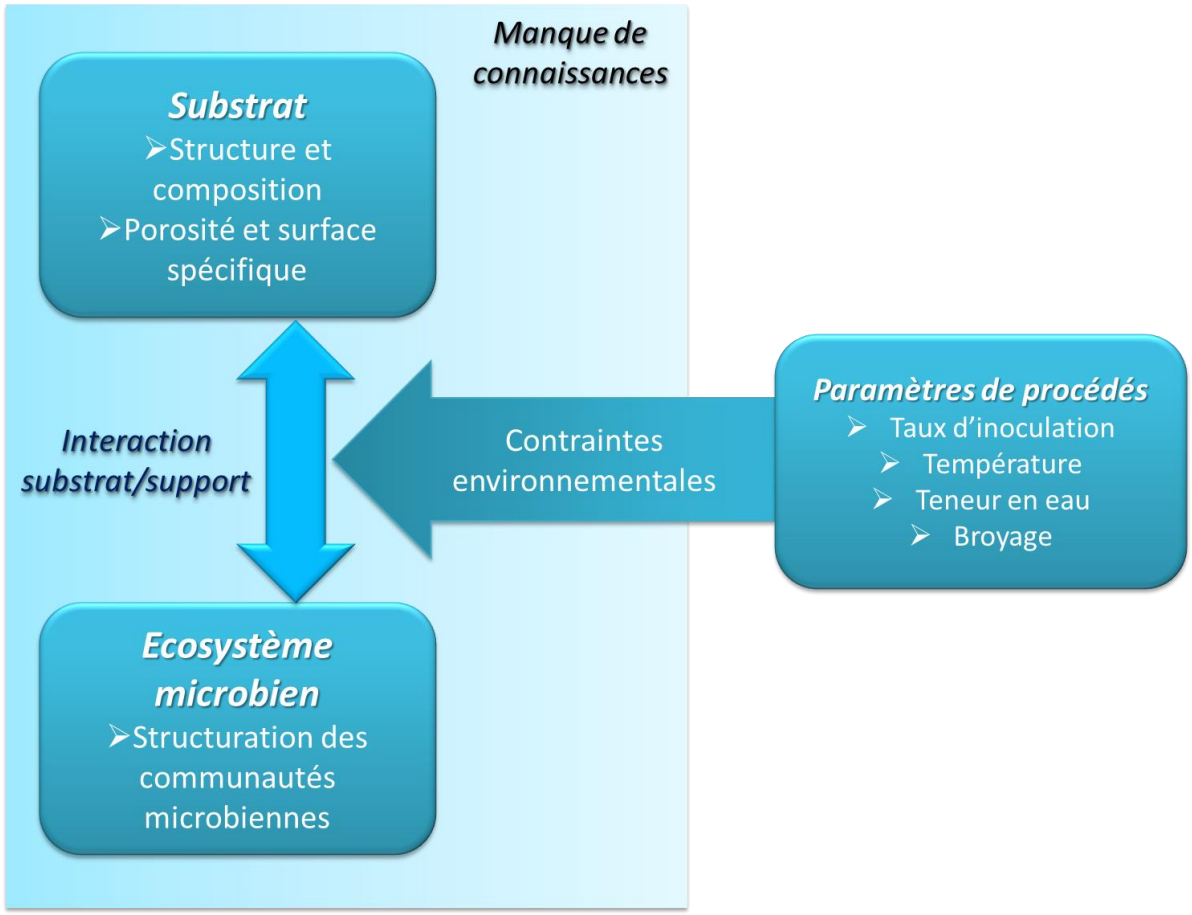


Figure 3-1 : L'interaction principale entre le substrat et la biomasse microbienne sous contrainte de paramètre de procédé.

3.2 STRATÉGIE D'ÉTUDE

Ainsi, l'optimisation de la digestion sèche passe par la mise en place d'une communauté microbienne efficace à la dégradation des substrats lignocellulosiques en condition de faibles teneurs en eau via l'ajustement des paramètres de procédé. Répondre à ce questionnement passe par l'établissement d'une stratégie d'étude commune visant à contrer les difficultés inhérentes à l'étude des milieux secs :

- Utilisation d'un modèle de substrat lignocellulosique suffisamment complexe pour refléter les variétés de structure et de composition des résidus agricoles : la paille de blé.
- Fonctionnement en mode batch mésophile puisque cette configuration est utilisée en digestion agricole et peut être extrapolée au digesteur continu piston.
- Evaluation dynamique des phénomènes étudiés pour prendre en compte les fortes évolutions du milieu en cours de fermentation.
- Observation des mécanismes de la digestion anaérobie par une très faible inoculation conduisant à un fort ralentissement permettant de décomposer les réactions biologiques successives et mettre en évidence la sélection des communautés microbiennes en fonction des conditions environnementales.

De plus, ces études ont nécessité plusieurs développements méthodologiques. Ainsi, un protocole de compartimentation microbienne a été développé pour séparer les micro-organismes en fonction de leur degré d'adhésion au support. Cette compartimentation couplée à l'analyse des communautés microbiennes permet d'aborder la notion de spatialisation des différents micro-organismes de la digestion anaérobie. Le suivi dynamique des réactions biologiques a nécessité la mise au point d'un dispositif permettant de prélever des échantillons solides (digestat) d'un digesteur en fonctionnement sans perturbation de la phase gazeuse.

3.3 MISE EN ŒUVRE

Cette approche du sujet à conduit à la réalisation de plusieurs séries d'expériences. Chacune apporte des réponses au questionnement de la thèse (Figure 3-2). Ainsi, la réponse au questionnement de la thèse passe par plusieurs étapes qui constituent la structure de la discussion de la thèse :

- Maitrise des hétérogénéités du substrat et les paramètres de procédé pour assurer la dégradation efficace du résidu lignocellulosique
- Comprendre le comportement des micro-organismes face aux faibles teneurs en eau, et en particulier ceux des étapes d'acidogenèses.

- Etudier la dégradation de la lignocellulose par la biomasse microbienne puis observer l'implantation et la structure de ces micro-organismes sur le substrat.
- Validation les résultats, observations et hypothèses dans des conditions d'inoculation plus proches de la littérature.

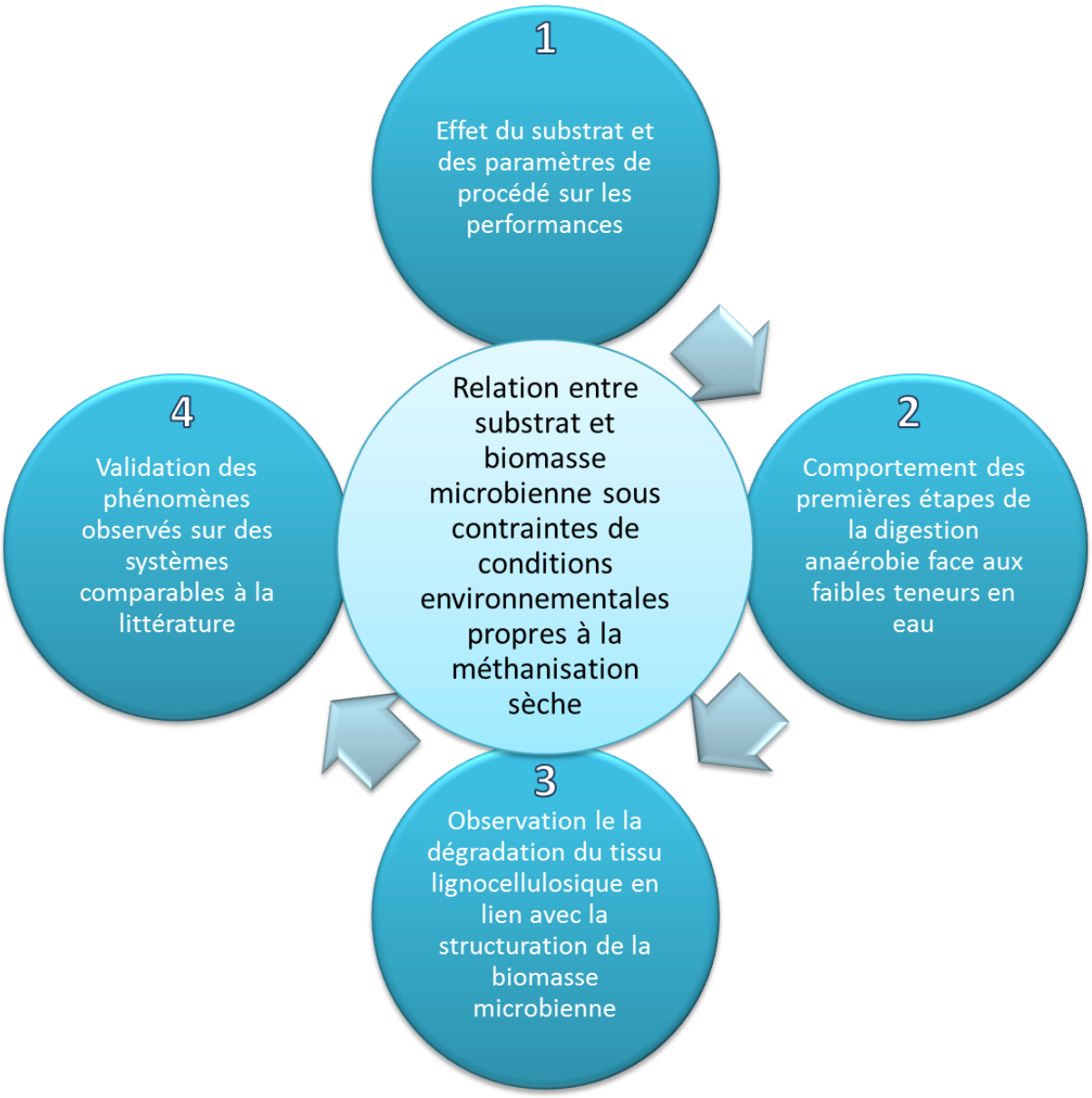


Figure 3-2 : Stratégie d'étude de la thèse.

4 MATERIELS ET METHODES

4.1 PRÉPARATION DU SUBSTRAT

4.1.1 LOT DE PAILLE

Afin de s'affranchir des risques liés à la variabilité du substrat, un lot de paille a été constitué au démarrage de la thèse et utilisé pendant trois ans. Cette paille de blé tendre (*Triticum Aestivum*) a été obtenue dans une ferme biologique située à Adissan dans l'Hérault (34 France), et récoltée et séchée durant l'été 2010 par l'agriculteur dans son exploitation. Un stock de 90 kg de paille de blé a été livré sous forme de 6 bottes de 15 kg chacune.

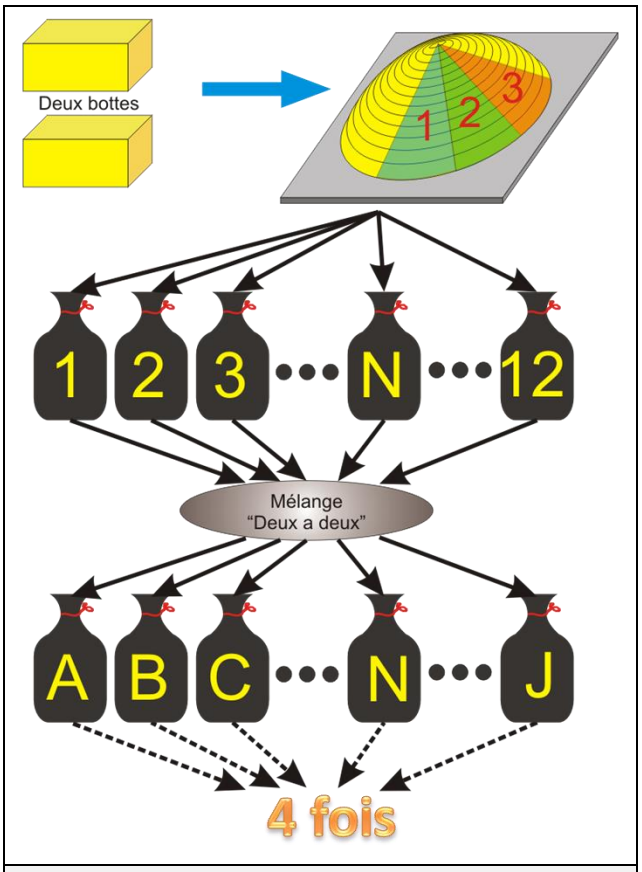


Figure 4-1 : Homogénéisation du substrat.

Le fractionnement morphologique de la paille ayant un impact important lors des échantillonnages, une homogénéisation du lot de paille a été réalisée par partage (Gy, 1998). Pour ce faire, les bottes de pailles ont été mélangées deux à deux puis partagées en 12 lots de 2,5 kg environs. Aléatoirement, chaque sac a été mélangé avec un autre puis divisé à nouveau en deux sacs. Finalement, après 4 mélanges successifs, 12 lots homogènes ont été formés.

Dans chaque sac, un échantillon de quelques dizaines de grammes a été prélevé pour caractériser le fractionnement morphologique du lot de paille. Parmi les 12 échantillons, 5 ont été aléatoirement sélectionnés puis triés manuellement afin de rassembler : les entre-nœuds, les nœuds, les feuilles, les épis (rachis et glumes) et les fragments divers ou non reconnaissables (principalement composés de fragment d'entre-nœuds, de feuilles et de glumes). Après ce tri, la masse de chacune de ces fractions a été mesurée indiquant ainsi la composition morphologique de la paille.

4.1.2 REDUCTION GRANULOMÉTRIQUE

Pour ce travail de thèse, trois tailles de particules, allant du centimètre au micromètre, ont été retenues (Figure 4-4). La paille a donc été broyée différemment pour obtenir les trois granulométries retenues. Dans tous les cas, des broyeurs à couteaux ont été utilisés afin de présenter des modes de broyages comparables pour les trois fractions. Ces broyeurs

consistent à entrechoquer les particules sur des chicanes et des couteaux d'un rotor tournant (2000-4000 rpm) pour fragmenter le matériel (Figure 4-2-a). Lorsque les particules sont de taille suffisamment faible, elles passent au travers d'un tamis dont le diamètre est choisi en fonction de la granulométrie ciblée. Dans un souci de reproductibilité, chaque broyage a été réalisé par lot de grande quantité. Un pré-broyage grossier (≈ 5 cm) a été réalisé systématiquement dans un broyeur à couteaux (Blik BB230) afin d'alléger l'énergie à fournir lors des broyages ultérieurs et diminuer la chaleur émise durant le broyage.

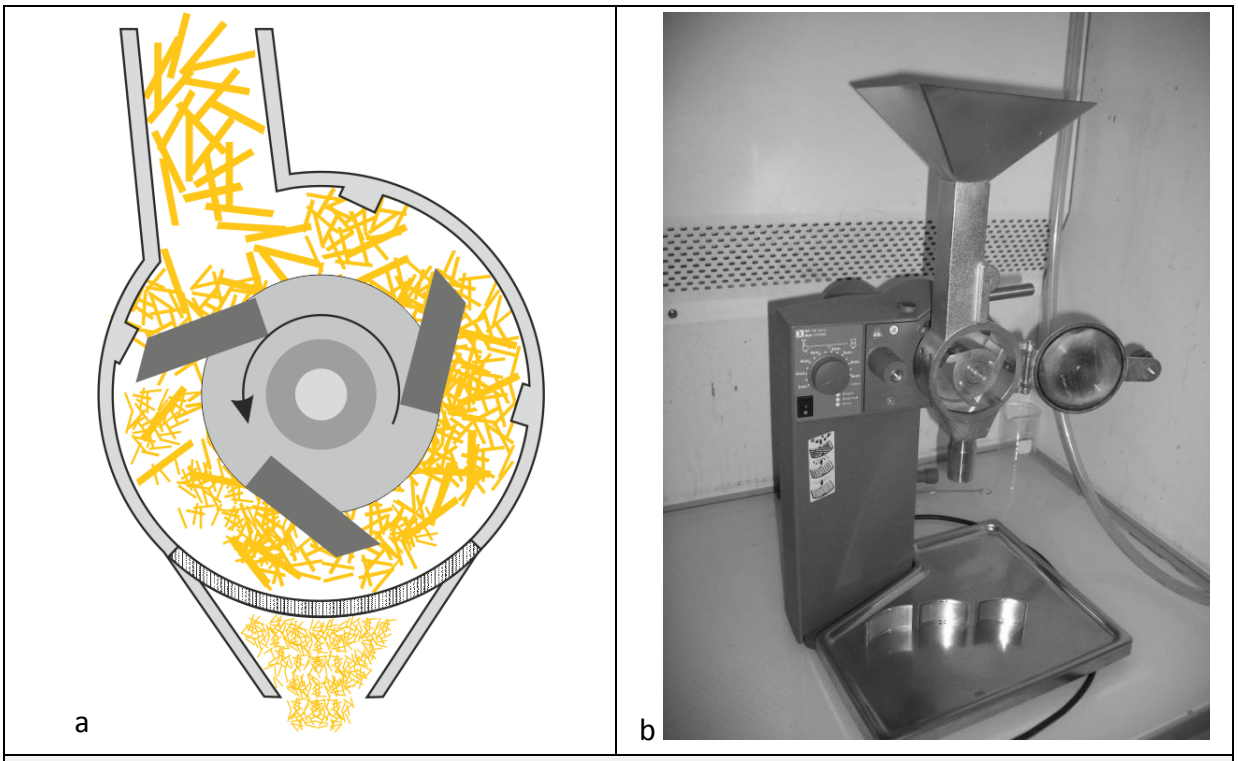


Figure 4-2 : Broyage à couteau.
(a) Schéma de fonctionnement d'un broyeur à couteaux. (b) Photo du broyeur à couteau IKA® MF 10.

La granulométrie « grossière », correspondant à des tailles de particules de l'ordre du centimètre a été obtenue en utilisant un broyeur à couteaux (RETSCH® SM100) équipé d'un tamis à 1 cm (Figure 4-3). Le broyat a ensuite été tamisé sur deux tamis en acier ayant des mailles de 1 et 0,4 cm. Les particules retenues sur le tamis supérieur (> 1 cm) ont été réintroduites dans le broyeur jusqu'à ce que la granulométrie soit satisfaisante. Le broyat passant au travers du second tamis (< 0,4 cm), représentant moins de 5% de la masse de paille (vérifié analytiquement) a été rejeté.

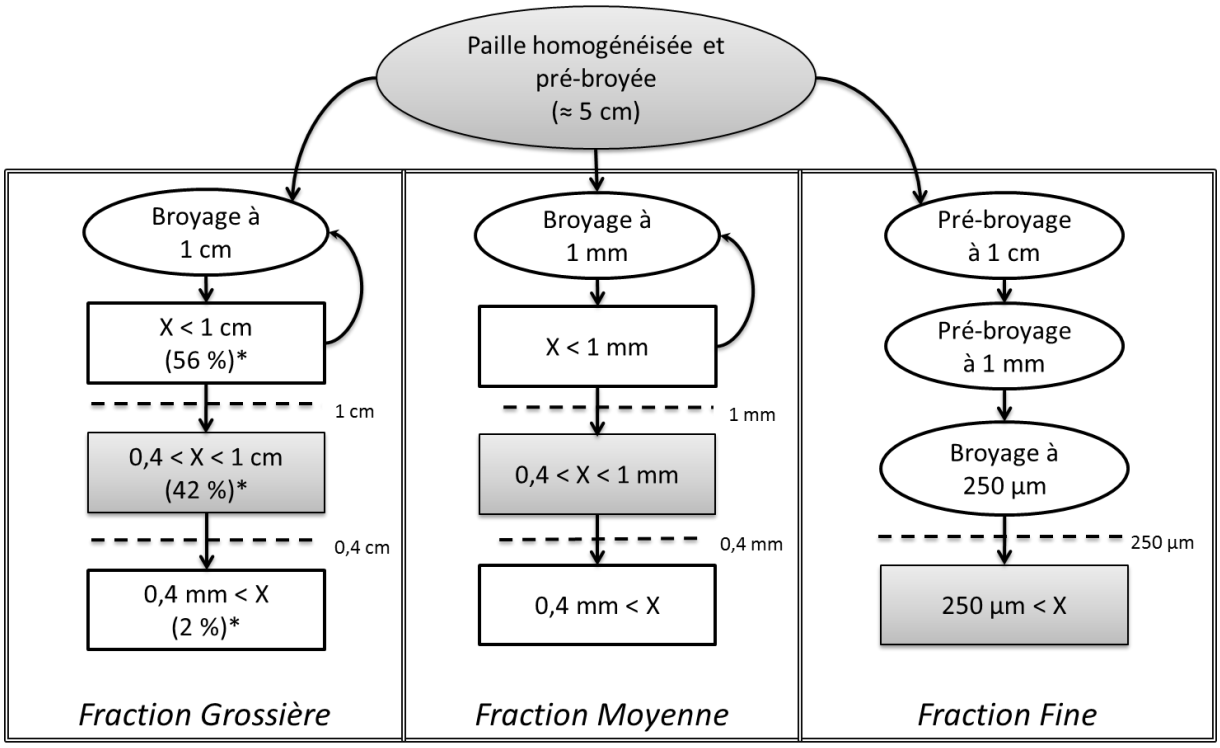


Figure 4-3 : Préparation des trois granulométries de paille.

La granulométrie « moyenne », correspondant à des particules de l'ordre du millimètre, a été obtenue par un broyage à couteaux (RETSCH® SM100) équipé d'un tamis de 1 mm (Figure 4-3). Le broyat a été tamisé entre 1 mm et 0,4 mm, afin de broyer de nouveau les particules trop grosses (> 1 mm) et d'éliminer les particules trop fines (< 0,4 mm). Les particules perdues lors de la préparation de cette fraction (poussières et particules trop fines) représentent moins de 10% de la masse de la paille initiale.

La granulométrie la plus « fine », correspondant à des particules de l'ordre du micromètre, est quant à elle obtenue grâce à un broyeur à couteaux (IKA® MF 10, Figure 4-2-b) équipé d'un tamis à 250 µm (Figure 4-3). En raison des forces électrostatiques importantes sur la poudre obtenue après broyage, il n'a pas été possible de tamiser cette fraction. Certaines particules particulièrement récalcitrantes au broyage n'ont pas pu être broyées (moins de 5% de la masse de paille initiale).

Enfin, les broyages les plus fins s'accompagnent d'un échauffement de la matière qui implique un séchage supplémentaire de l'échantillon. Ainsi, les particules les plus fines présentent une teneur en matières sèches (94%) plus importante que celles de la granulométrie moyenne ou grossière (≈ 93%). Après broyage, les lots ont été conservés hermétiquement dans des récipients en plastique.

a

b

c

Figure 4-4 : Observations microscopiques des trois tailles de particules retenues.
(a) Granulométrie grossière. (b) Granulométrie moyenne. (c) Granulométrie fine.
Observations réalisées par Françoise Watteau.

4.1.3 GRANULOMÉTRIE

La paille ayant une forte tendance à passer verticalement dans les mailles des tamis (broyeur ou tamiseur), une caractérisation de la granulométrie des fractions a été nécessaire afin de vérifier et quantifier le diamètre moyen. Celle-ci a été réalisée par deux outils complémentaires liés à la taille des particules pouvant être mesurée : un granulomètre laser (< 2 mm) et un tamiseur vibrant (> 0,2 mm).

Le granulomètre laser (Beckman Coulter LS 200) permet la mesure des particules de 0,3 à 2000 µm. Cet instrument consiste en un entrainement des particules par de l'eau jusqu'à une cellule de mesure. La détection des particules par l'interruption d'un laser permet de déterminer leur taille en les assimilant à une sphère. Bien que très précis, ce granulomètre présente plusieurs limitations dans le cas de la paille : passage de l'échantillon en phase aqueuse (problème de gonflement et de flottation de la paille), assimilation des particules à une sphère, granulométrie maximale insuffisante (2 mm). Pour cette dernière raison, seule la granulométrie fine a pu être déterminée sur cet instrument.

Un tamiseur vibrant a permis de mesurer la distribution de taille des particules de granulométries moyenne et grossière. En raison des forces électrostatiques importantes des particules fines, la paille broyée finement n'a pu être caractérisée sur le tamiseur vibrant (toutes les particules retenue sur un seul tamis à 200 µm). Cet instrument repose sur une classification des particules en fonction de leur capacité à passer au travers des mailles d'une série de tamis de finesse croissante. Les tamis retenus ont été répartis de 4 à 0,2 mm (12 tamis) pour la granulométrie grossière et de 1,25 à 0,2 mm (10 tamis) pour la granulométrie moyenne. Les données obtenues ont donc permis de déterminé la taille moyenne des particules de manière moins précise que le granulomètre laser.

4.1.4 SURFACE SPÉCIFIQUE

La mesure de surface spécifique des trois granulométries a été réalisée par Sandra Constant à l'institut Charles Gerhardt de Montpellier (équipe de recherche « Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé »). La méthode repose sur l'analyse de l'adsorption et de la désorption d'un gaz (azote en l'occurrence) sur la surface de l'échantillon (Chesson, Gardner & Wood, 1997). L'échantillon sec est dégazé sous vide afin de libéré la surface de la présence de molécules d'eau ou d'autres composés adsorbés. Ensuite, de l'azote gazeux à 77 K est ajouté et l'isotherme d'adsorption est alors enregistré par relevé massique. La désorption est ensuite suivie lors du dégazage de l'échantillon. L'analyse de l'isotherme est alors réalisée selon la théorie de Brunauer, Emett et Teller (BET) qui permet de déterminer le volume occupé par l'adsorbat (azote). Cette valeur est ensuite ramenée à la surface de l'échantillon.

4.2 CONDUITE DES DIGESTEURS

4.2.1 EVALUATION DU POTENTIEL MÉTHANE ET HYDROGÈNE

4.2.1.1 Potentiel méthane

Le potentiel méthane (BMP, « Biochemical Methane Potential ») d'un substrat est évalué par le suivi de la production de méthane d'une quantité précise de substrat en conditions non limitantes (forte inoculation) (Angelidaki *et al.*, 2009). L'inoculum utilisé est une boue granulaire issue d'un digesteur anaérobie de type UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) traitant des effluents d'une sucrerie située à Marseille. Une masse précise de substrat (environ 1 g de MS) est introduite dans une fiole en verre de 500 mL, dont le volume exact a été préalablement déterminé. Pour lisser les erreurs lors de l'ajout successif de solution, un volume important de milieu est préparé contenant : de l'inoculum (pour un ratio S/X final de 0,5 en MV), du tampon bicarbonate (2,6 g.L^{-1}), une solution de macroéléments (NH_4Cl à 229 mg.L^{-1}; KH_2PO_4 à 86 mg.L^{-1}; $MgCl_2, 6H_2O$ à 52 mg.L^{-1}; $CaCl_2, 2H_2O$ à 26 mg.L^{-1} et $Na_2S, 9H_2O$ à 100 mg.L^{-1}) et une solution de microéléments ($FeCl_2, 4H_2O$ à 20 mg.L^{-1}; $CoCl_2, 6H_2O$ à 5 mg.L^{-1}; $MnCl2, 4H_2O$ à 1 mg.L^{-1}; $NiCl_2, 6H_2O$ à 1 mg.L^{-1}; $ZnCl_2$ à 0,5 mg.L^{-1}; H_3BO_3 à 0,5 mg.L^{-1}; Na_2SeO_3 à 0,5 mg.L^{-1}; $CuCl_2, 2H_2O$ à 0,4 mg.L^{-1}; $Na_2MoO_4, 2H_2O$ à 0,1 mg.L^{-1}). Ce milieu est réparti convenablement dans chaque fiole, puis un ajout d'eau permet d'assurer une dilution suffisante et un volume final du milieu dans la fiole de 400 mL. Les fioles sont alors celées et le ciel gazeux remplacé par de l'azote. Pour chaque série d'expérience, un témoin chaud (glucose comme substrat) est réalisé afin de vérifier l'activité des boues ainsi que deux témoins froids (fioles sans substrat) afin de mesurer la quantité de méthane produite par l'inoculum (respiration endogène). Chaque fiole est ensuite incubée à 35°C sur une table agitante.

Le suivi de la production de biogaz est réalisé par des mesures de pression (Manomètre LEO 2 (Keller) ayant 1 mbar de résolution). La pression initiale (P_j) est mesurée, puis un prélèvement de gaz est effectué pour une analyse au micro-chromatographe en phase gazeuse (µGC) avant dégazage. Ce µGC (Varian lGC-CP4900) permet l'injection (injecteur à 100°C) de 3 mL d'échantillon de biogaz par pompage du ciel gazeux. Deux colonnes capillaires à 30°C permettent la séparation respective du CO_2 (colonne HayeSep A) puis de l'O_2, du N_2, du CH_4 et de l'H_2S (Molsieve 5Å PLOT). De l'hélium est employé comme gaz vecteur et permet l'entrainement de l'échantillon au travers des colonnes jusqu'au détecteur TCD (Thermal Conductivity Detector). Le µGC est calibré, comme les autres instruments d'analyse du biogaz, avec un mélange de gaz étalon standard composé de 25% de CO_2, 2% d'O_2, 10% de N_2 and 63% de CH_4 (précision de 0,1 ppm). Après analyse, la pression finale (P_{j+1}) est relevée.

$$\Delta V_j = \left[\frac{(y_j.P_j - y_{j-1}.P_{j-1}).V_{ciel}}{R.T}\right].\frac{R.T_0}{P_0} \qquad \text{Équation 24}$$

Ainsi, selon l'Équation 24, il est possible de connaitre le volume d'un biogaz (méthane ou biogaz total) produit en connaissant précisément le volume de ciel gazeux (V_{ciel}), la température (T), la pression et les compositions en biogaz du jour (P_j et y_j) ainsi que celles de la précédente analyse (P_{j-1} et y_{j-1}). Ce volume est ramené aux conditions standards de température et de pression (T_0 à 273,15K et P_0 à 1 atm). La respiration endogène est alors soustraite au volume de biogaz calculé, puis la production est ramenée à la quantité de substrat ajoutée dans le BMP (exprimé en MS ou MV). Ces productions sont alors cumulées afin d'obtenir la quantité de méthane et de biogaz produite.

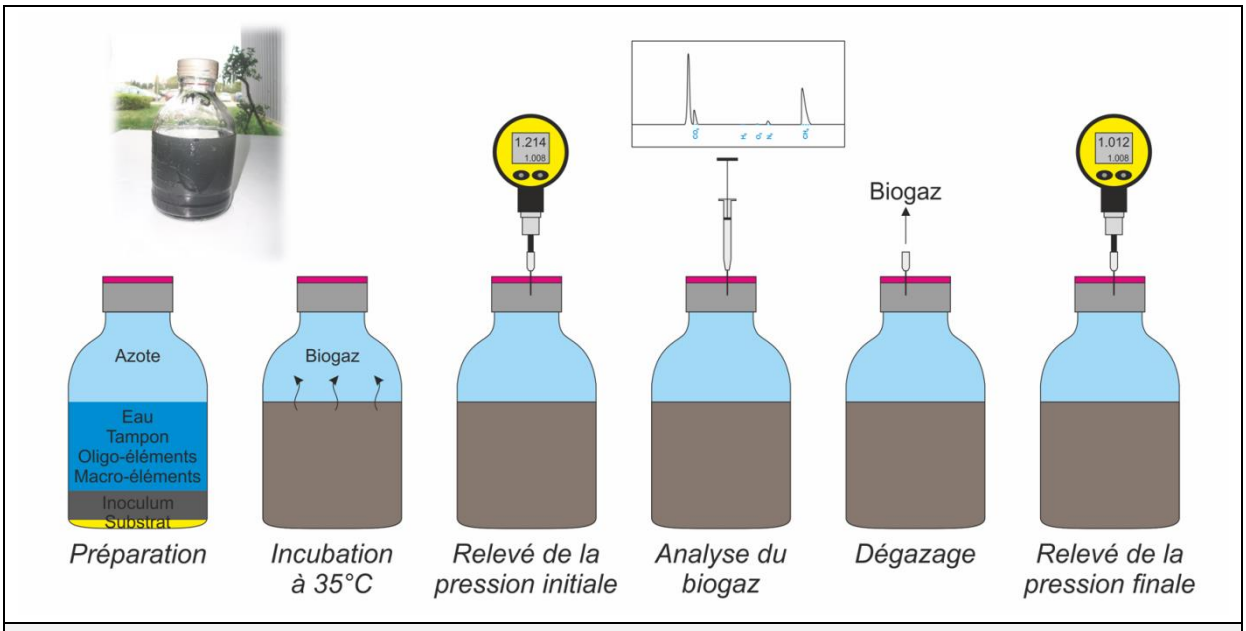


Figure 4-5 : Méthodologie employée pour le suivi de la production de méthane.

4.2.1.2 Potentiel hydrogène

L'évaluation du potentiel hydrogène est réalisé par le test BHP (Biochemical Hydrogen Potential). La méthode est très semblable au test BMP et consiste à évaluer la quantité d'hydrogène produite à partir d'une quantité connue de substrat.

L'inoculum employé dans ce cas nécessite un prétraitement afin d'inhiber l'activité méthanogène responsable d'une consommation d'hydrogène (Fang *et al.*, 2006; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006). Cette inhibition est réalisée via un choc thermique (90°C durant 20 minutes) ayant pour objectif de lyser les cellules incapables de sporuler tels que les *Archaea* méthanogènes. Ce traitement conduit donc à une simplification de l'inoculum pour favoriser les espèces acidogènes et acétogènes. Cinq grammes d'échantillons sont ajoutés dans une fiole en verre de 500 mL et le ratio S/X est fixé à 20 (rapport en MV). Le milieu est composé d'un tampon minéral permettant de maintenir le pH en milieu acide (5,5) : tampon MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) à 50 mM (9,76 $g.L^{-1}$). Le milieu est complété

d'une solution d'oligoéléments : $FeCl_2, H_2O$ à 1,5 g.L^{-1}; H_3BO_3, H_2O à 62 mg.L^{-1}; $MnSO_4, H_2O$ à 117 mg.L^{-1}; $CoCl_2, 6H_2O$ à 26 mg.L^{-1}; $ZnCl_2$ à 120 mg.L^{-1}; $NiCl_2, 6H_2O$ à 28 mg.L^{-1}; $CuCl_2, 2H_2O$ à 38 mg.L^{-1}; $NaMoO_4, 2H_2O$ à 31,8 mg.L^{-1} et HCl à 1,6 mM. Le ciel gazeux des fioles est remplacé par de l'azote et les fioles sont incubées dans un bain marie à 35°C ou 55°C.

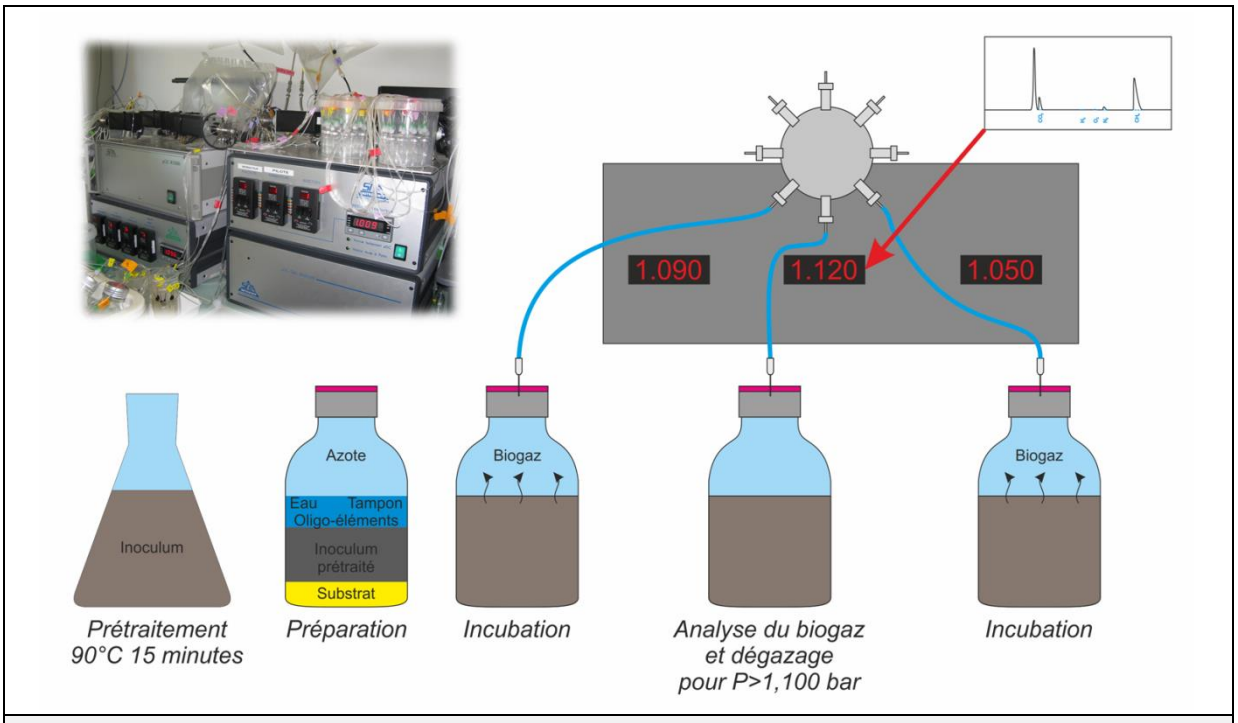


Figure 4-6 : Méthode employée pour la préparation et le suivi et des potentiels hydrogène.

En raison des cinétiques rapides des BHP (5 à 7 jours), le suivi de production de biogaz est réalisé en continu sur un micro-chromatographe en phase gazeuse multiplexé (µGC R3000, SRA instrument). Le multiplexage des voies permet de connecter et de suivre simultanément 28 fioles. Le µGC est composé d'un injecteur et de deux colonnes capillaires chauffées à 80°C ainsi que d'un micro-catharomètre (détecteur µTCD). La première colonne, colonne MolSieve 5Å (10 m de longueur et 0,32 mm de diamètre) dédiée au CO_2, utilise de l'argon comme gaz vecteur (à une pression de 30 psi). La seconde colonne est une colonne PLOT Q (8 m de longueur et 0,32 mm de diamètre) dédiée à la détection de l'O_2, l'H_2, N_2 et CH_4. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur (à une pression de 20 psi). Chaque fiole est analysée toutes les 4 heures par un relevé de pression suivi d'une analyse de gaz uniquement si la pression est supérieure à 1,1 bar. Cette consigne permet de maintenir une pression au sein du ciel gazeux dans une gamme comprise entre 1,1 et 1,2 bar en moyenne. Malgré un pas de temps plus restreint, la méthode de calcul est similaire au test BMP (Équation 24). Ce mode d'analyse permet d'obtenir un profil de biogaz avec une résolution de 4 heures, mais un profil de production d'hydrogène dépendant de la cinétique réactionnelle.

4.2.2 DIGESTEURS DISCONTINUS EN VOIE SÈCHE

A la différence du test BMP, les réacteurs discontinus en voie sèche sont réalisés dans des conditions de faibles teneurs en eau. Ce simple facteur conditionne une mise en œuvre particulière lors de la préparation des digesteurs de type voie sèche. La composition du milieu est calculée par bilan de matière. La prédétermination de plusieurs paramètres est requise : la teneur en eau, le ratio S/X, la masse de milieu, le ratio C/N et la concentration en tampon. L'objectif du calcul consiste en la détermination de la masse de substrat, du volume d'inoculum, de la masse de tampon, de la quantité d'azote et de la quantité d'eau à ajouter. Ces calculs nécessitent la détermination préalable et précise de la teneur en MS et MV de l'inoculum et du substrat, pour ajuster leur quantité respective. La concentration en tampon bicarbonate est fixée à 2,6 $g.kg^{-1}$, tandis que l'azote est ajouté sous forme de NH_4Cl (C/N fixé à 40). Enfin, une solution d'oligoéléments (concentration identique au test BMP) est ajoutée dans un volume de 2,5 $mL.kg^{-1}$, en négligeant cet apport de matières sèches au milieu (volume d'oligoéléments assimilés à de l'eau).

Figure 4-7 : Photo des dispositifs expérimentaux.
(a) Digesteurs par voie sèche à faible inoculation. (b) Digesteurs par voie sèche à forte inoculation.

Après calcul, le substrat est introduit dans une fiole dont le volume est connu précisément (Figure 4-7). Un mélange composé de l'inoculum, des oligo-éléments, du tampon, du NH_4Cl et de l'ajout d'eau est réalisé en parallèle. Une masse précise de mélange est alors ajoutée au substrat. Le milieu ainsi formé est agité manuellement, le ciel gazeux est remplacé par de l'azote et la fiole scellée. Les réacteurs sont alors incubés à une température de 35°C ou 55°C. Selon les expériences, la production de biogaz a été suivie :

- par mesure de pression et µGC pour la mesure de la production d'hydrogène en voie sèche (voir section sur la mesure du potentiel hydrogène). (Chapitre 5.1 et 5.3)

- par mesure de pression et chromatographie en phase gazeuse (GC) pour les expériences à S/X faible. (Chapitre 5.2)
- par compteur de gaz et chromatographie en phase gazeuse (GC) pour les expériences à S/X modéré. (Chapitre 5.4)

Une production importante est attendue dans les réacteurs par voie sèche. Par conséquent, sceller de telles fioles pour suivre le différentiel de pression présente des risques. Ainsi, des compteurs volumétriques (Ritter® MilliGascounters) préalablement calibrés ont été connectés sur les fioles. Le biogaz produit est entrainé jusqu'à une cellule de mesure dont le volume est connu et qui se remplit progressivement de biogaz. Dès que la cellule est remplie, elle bascule enregistrant ainsi une impulsion. Ainsi, connaissant le volume d'une cellule, le volume de ciel jusqu'à la cellule (ciel et tuyaux), le nombre d'impulsions au cours du temps (n) et la composition du biogaz (y), il est possible de déterminer régulièrement le volume de biogaz (acquisition toutes les 3 minutes) selon l'Équation 25 et de méthane à chaque analyse de gaz (tous les 2 à 3 jours) selon l'Équation 26. Ce mode d'analyse permet d'obtenir un profil de biogaz désynchronisé du profil de production d'hydrogène.

$$\mathrm{V}_{biogaz} = \mathrm{n}.V_{cellule}.\frac{T_0}{T} \qquad \text{Équation 25}$$

$$\mathrm{V}_y = \underbrace{\left[V_{ciel}.\left(y_j - y_{j-1}\right)\right].\frac{T_0}{T}}_{Variation\ du\ gaz\ dans\ le\ ciel} + \underbrace{\left[\left(\mathrm{n}_j - \mathrm{n}_{j-1}\right).V_{cellule}\right].\frac{\left(y_j - y_{j-1}\right)}{2}}_{Variation\ du\ gaz\ dans\ le\ biogaz\ produit} \qquad \text{Équation 26}$$

Les méthaniseurs par voie sèche ont été suivis par chromatographe en phase gazeuse (Perkin Elmer Clarus® 580). Après injection de 200 µl d'un échantillon, ce chromatographe permet la séparation du CO_2 via une colonne capillaire Rt-Q-bond (30 m de longueur et 0,32 mm de diamètre intérieur) ainsi que la séparation de l'H_2, de l'O_2, du N_2 et du CH_4 via une colonne capillaire Rt-Molsieve 5 Å (30 m de longueur et 0,32 mm de diamètre intérieur). Les échantillons sont entrainés de l'injecteur (250°C) jusqu'à un détecteur TCD (150°C) grâce à de l'argon comme gaz vecteur (350 kPa et 34 mL.min^{-1}). Ce GC est calibré pour permettre de mesurer la production éventuelle d'hydrogène.

La conduite des réacteurs fermentaires en voie sèche (producteur d'hydrogène) a été mise au point lors de cette thèse. La mise en œuvre découle du protocole de détermination du BHP qui a été adapté pour tenir compte des réductions des teneurs en eau. Les calculs ont été conduits selon la méthode de calcul des digesteurs secs. Les ratios S/X, les siccités, les concentrations en tampon et la masse de milieu ont donc été ajustés. La quantité de tampon MES (19 g.L^{-1}), 4 mL de solution d'oligo-éléments et de la soude pour ajuster le pH initial ont été ajouté au milieu. De plus, l'inoculum a été prétraité thermiquement pour inhiber l'activité méthanogène de l'inoculum. Le suivi de ces réacteurs a été réalisé via le µGC précédemment décrit dans la section 4.2.1.2. Par conséquent, ce mode d'analyse permet d'obtenir un profil de biogaz désynchronisé du profil de production d'hydrogène.

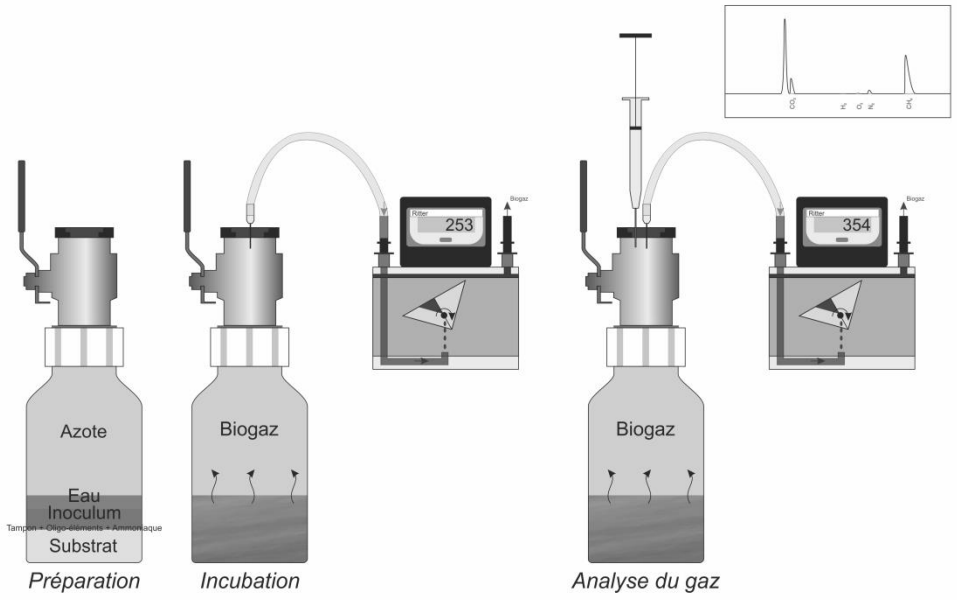


Figure 4-8 : Suivi du biogaz par compteur volumétrique.

4.2.3 SUIVI DYNAMIQUE DES DIGESTEURS

4.2.3.1 Développement de la canne de prélèvement

L'ouverture d'un digesteur pour prélever un échantillon conduit à une perturbation du ciel gazeux. Ces perturbations modifient les équilibres physico-chimiques au sein du milieu et sont particulièrement problématiques dans le cas de conditions expérimentales où les milieux peuvent facilement s'acidifier (Brouckaert *et al.*, 2013). Par conséquent, dans la littérature, la notion de dynamique de dégradation est abordée par la méthode des fioles sacrifiées (Shi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Cette méthodologie consiste à utiliser de très nombreux réplicats (réacteurs) dont l'arrêt est programmé à différentes étapes de la réaction biologique. Les inconvénients majeurs de cette technique sont liés à la maitrise des variations inter-réplicats et au grand nombre de réacteurs. Pour contrer ces limites, un dispositif de prélèvement d'échantillons en atmosphère contrôlée a été développé dans le cadre de cette thèse. Ce développement fut valoriser sous la forme d'une demande de brevet déposé en mai 2013 à l'INPI (Dispositif et procédé de prélèvement d'échantillon).

Ce système se compose d'une canne de prélèvement amovible permettant un prélèvement par carottage, et des réacteurs adaptés pour maintenir l'étanchéité durant le prélèvement (Figure 4-9). Ces réacteurs sont munis d'une vanne (3) servant de sas d'isolement. Pour suivre la production de biogaz, un septum (2) est fixé sur cette vanne qui est en position ouverte en cours de fermentation. Lors d'un prélèvement, la vanne est fermée, isolant ainsi le milieu, et le septum retiré. La canne de prélèvement (1) vient se fixer sur la vanne, puis la chambre de carottage est soumise à un flux d'azote pour évacuer l'oxygène. La vanne est ensuite ouverte pour laisser descendre la canne de prélèvement dans le milieu et effectuer un prélèvement par carottage. La carotte de milieu est ensuite

remontée, la vanne refermée et l'échantillon récupéré dans un flacon. Un septum neuf est alors fixé et la vanne ouverte pour poursuivre la réaction. Avec ce système, la perturbation du ciel gazeux (par de l'azote uniquement) est inférieure à 1% en volume.

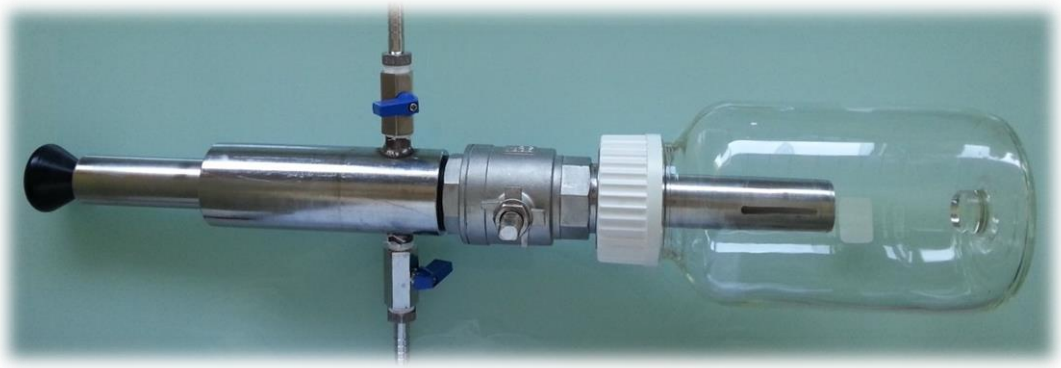


Figure 4-9 : Canne et réacteur de prélèvement.
Détail disponibles en Dispositif et procédé de prélèvement d'échantillon.

4.2.3.2 Traitement des prélèvements

Que ce soit pour l'analyse des conditions initiales, intermédiaires ou finales, chaque prélèvement a été traité selon le plan illustré sur la Figure 4-10. L'objectif de ce plan de traitement des prélèvements est de maximiser les informations obtenues pour chaque échantillon soit en réalisant immédiatement les analyses, soit en assurant un stockage pérenne des échantillons. Ainsi, le milieu réactionnel, la phase liquide, la phase solide sont stockés en tenant compte des contraintes analytiques.

L'analyse du milieu (matières sèches, volatiles et minérales, état de l'eau) ne nécessite pas de traitements particulier, puisque l'échantillon doit être analysé à l'état frais. L'analyse de la phase liquide consiste à diluer à environ 5% de MS l'échantillon frais. La dilution finale est évaluée précisément par gravimétrie. Après agitation et mesure du pH, la suspension est filtrée à 2,7 µm avec un filtre GF/F Whatman en fibres de verre. Une partie de la phase liquide obtenue est alors analysée pour mesurer les AGV, les métabolites, la DCO soluble, l'ammoniaque et les phénols, tandis que le reste du filtrat est congelé pour le dosage des sucres solubles. Les analyses microbiologiques nécessitent la congélation à -20°C d'une masse précise d'échantillon pour une analyse ultérieure. La compartimentation microbienne doit être réalisée dans les 24 heures suivant le prélèvement, en maintenant les échantillons au frais (section 4.4.2). Les observations microscopiques essentiellement réalisées par Françoise Watteau du Laboratoire sols et environnement (LSE) sont effectuées à l'état frais (envoi postal). Pour finir, la phase solide a été obtenue par congélation puis lyophilisation du reste de l'échantillon.

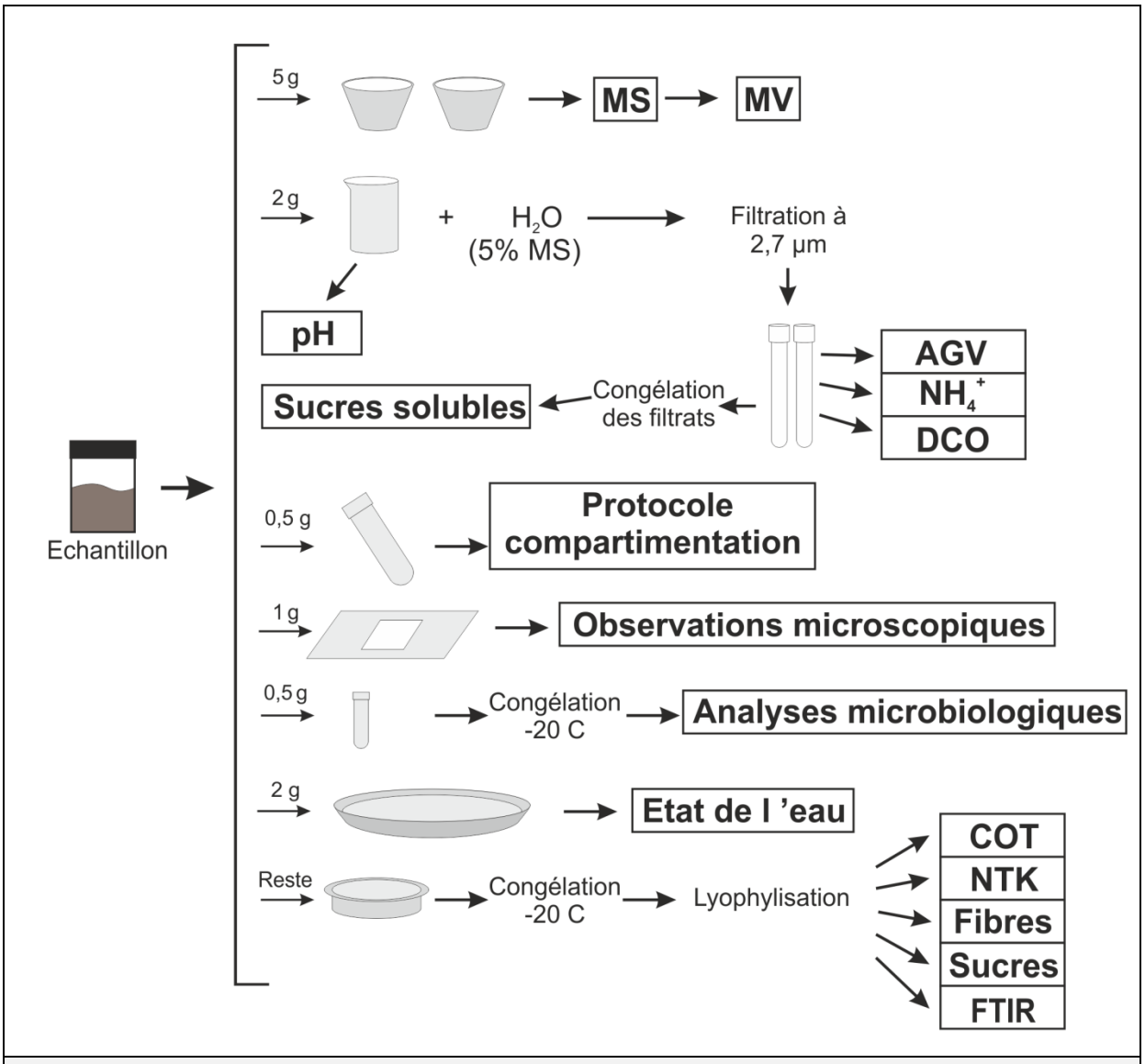


Figure 4-10 : Représentation schématique du traitement des prélèvements.

4.3 CARACTÉRISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES

4.3.1 PARAMÈTRES GLOBAUX

4.3.1.1 Matières sèches, volatiles et minérales

Le dosage des matières sèches, volatiles et minérales, a été réalisé par gravimétrie. Une masse connue d'échantillon est ajoutée dans un creuset en porcelaine sec dont la tare a été préalablement relevée. L'échantillon est ensuite séché à 105°C pendant 48 heures puis refroidi à température ambiante dans un dessiccateur. La différence de masse avant et après séchage correspond alors à la teneur en eau évaporée permettant de déterminer la teneur en matières sèches (MS) de l'échantillon. Ensuite, l'échantillon est calciné à 550°C durant 3 heures. Après refroidissement et pesée, la teneur en matières minérales (MM) est déterminée comme étant la masse de résidu de calcination. La teneur en matières volatiles (MV) est évaluée par différence entre la teneur en matières sèches et minérales.

4.3.1.2 Teneur en eau critique

La teneur en eau critique, W_c, correspond à la quantité d'eau minimale au-delà de laquelle l'eau est présente sous la forme libre dans une matrice. En dessous de ce seuil, l'eau est uniquement sous forme liée (eau d'hydratation, vicinale et surtout capillaire). Cette valeur seuil définie donc la limite entre l'eau libre ($> w_c$) et l'eau liée ($< w_c$) (Garcia-Bernet *et al.*, 2011a). Cette mesure est réalisée à l'aide d'un dessiccateur halogène, qui permet de sécher un échantillon à 105°C tout en relevant sa masse au cours du séchage. L'évolution de la perte de masse au cours du temps est alors obtenue (Figure 4-11-a) (Jannot, 2006). Ce profil est alors dérivé pour obtenir la vitesse de séchage (flux d'évaporation d'eau) qui peut être tracée en fonction de la teneur en eau résiduaire (Figure 4-11-b). Un traitement du signal est réalisé par un lissage de Savitzky-Golay en utilisant la fonction SAVGOL sous Matlab® (Version 7.11.0.584, R2010b). Une fois l'échantillon à température, le flux d'évaporation est stable au cours du temps et présente un profil linéaire. Lorsque l'eau liée à la matière commence à s'évaporer, la vitesse d'évaporation chute drastiquement. La quantité d'eau contenue à ce moment dans la matrice correspond à la teneur en eau critique. Mathématiquement, cette chute de vitesse est déterminée par un écart du profil de vitesse supérieur à 1% avec la droite passant par le profil d'évaporation stationnaire (droite orange de la Figure 4-11-b). En dérivant une seconde fois le profil de séchage, un profil de décélération est obtenu (Figure 4-11-c). Sous cette représentation, un flux de séchage constant est traduit par une valeur nulle, et celui-ci devient positif lorsque le séchage ralentit. Ainsi, lorsque le profil dépasse la droite représentant le seuil maximal du bruit de fond (droite bleu de la Figure 4-11-c), l'abscisse correspondant à la teneur en eau critique est relevée. La moyenne des w_c des deux méthodes d'analyse est retenue comme teneur en eau critique de l'échantillon.

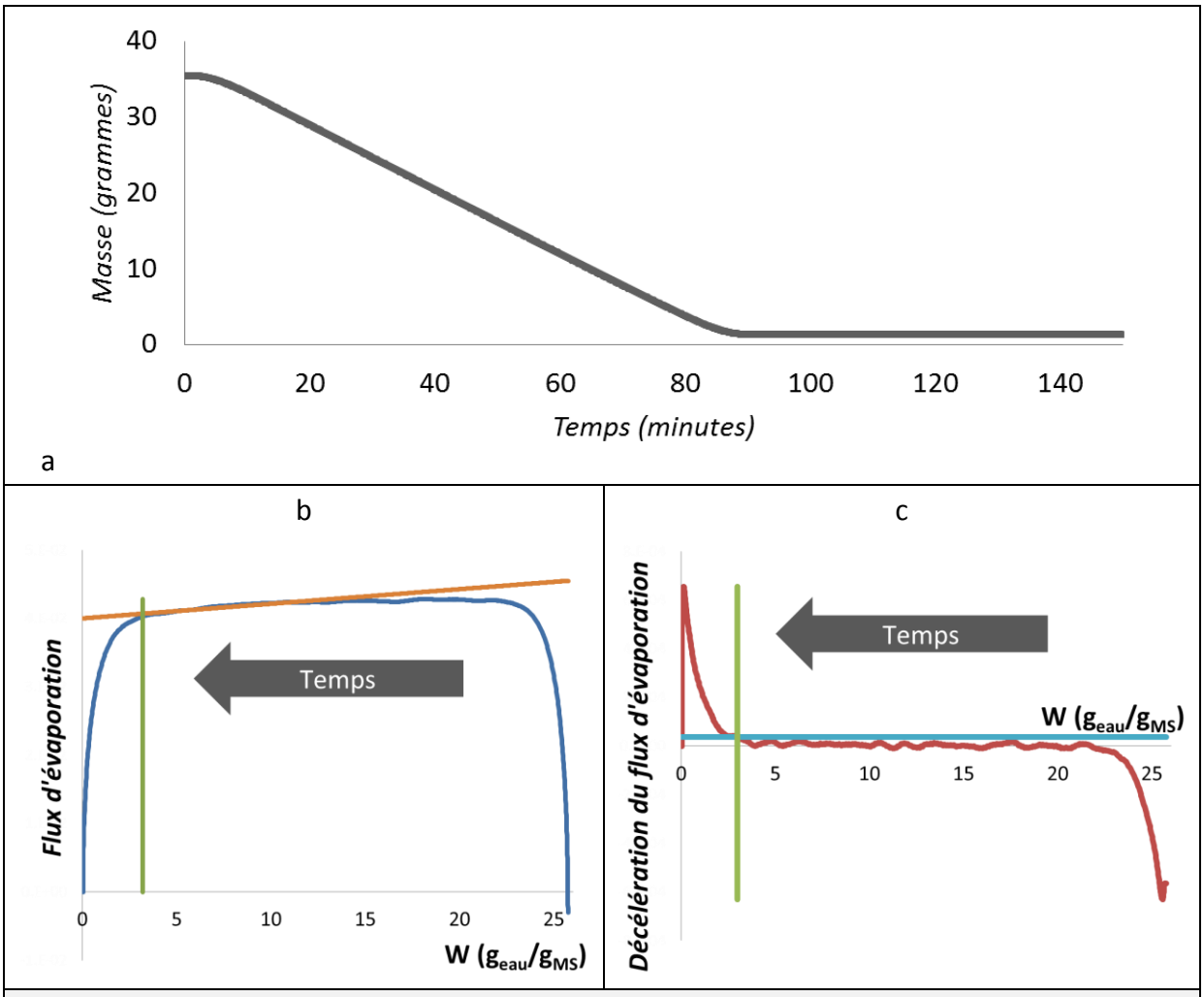


Figure 4-11 : Mesure de la distribution entre eau libre et eau liée.
(a) Profil de séchage brut issu du dessiccateur. (b) Flux d'évaporation et détermination de la teneur en eau critique w_c. (c) Décélération du flux et détermination du w_c correspondant.

4.3.1.3 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire de la paille a été réalisée sur un analyseur élémentaire FLASH 2000 (ThermoFisher Scientific®). La méthode repose sur une combustion de l'échantillon à 950°C suivi d'une oxydation catalytique pour réduire les NO_x et le SO_3 respectivement en N_2 et SO_2. Les gaz libérés (N_2, CO_2, SO_2 et H_2O) sont alors séparés sur une colonne de chromatographie puis détectés par un catharomètre. L'analyse permet ainsi le dosage du carbone (C), de l'hydrogène (H), de l'azote (N) et du souffre (S). L'oxygène (O) est dosé indépendamment par une combustion à 1000°C, où il est transformé en CO, séparé des autre gaz par chromatographie puis détecté par un catharomètre.

4.3.2 PHASE LIQUIDE

4.3.2.1 pH

Pour vérifier le maintien de conditions propices à la méthanogenèse, le pH est mesuré durant la préparation de la phase liquide, sur le digestat dilué avant filtration (Staley *et al.*, 2011). Cette mesure a été réalisée à l'aide d'une sonde pH correctement calibrée (EUTECH Instrument®, pH 510).

4.3.2.2 Métabolites

Les principaux métabolites produits lors de la digestion anaérobie (AGV, acide lactique, éthanol) peuvent être dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'HPLC est constituée d'un passeur automatique d'échantillons (Water 717 plus), d'une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-rad) pour filtrer les résidus éventuels, ainsi que d'une colonne Aminex HPX-87H (300 mm sur 7,8 mm, Bio-rad). L'éluent utilisé est une solution d'acide sulfurique à 0,005 M à un débit de 0,4 $mL.min^{-1}$. Cet instrument est calibré pour le dosage du glucose, du fructose, de l'éthanol ainsi que des acides lactique, acétique, propionique, butyrique, valérique et caproïque. Cependant, il est nécessaire d'obtenir une très grande précision pour la mesure des acides gras volatils (AGV), puisque ce sont les principaux acides organiques produits lors de la méthanisation. De par leur nature volatile, il est possible de les doser précisément par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé (Perkin Clarus 580) contient un injecteur chauffé à 250°C, une colonne capillaire Elite-FFAP crossbond®carbowax® (15 m) chauffée à 200°C et utilisant de l'azote à 6 $mL.min^{-1}$ en gaz vecteur, ainsi qu'un détecteur FID chauffé à 280°C. Les échantillons ont été préparés en mélangeant 0,6 µL de filtrat (phase liquide) avec 0,6 µL d'une solution aqueuse à 1 $g.L^{-1}$ d'étalon interne (acide éthyle-2-butyrique). L'étalonnage externe du GC est réalisé par une solution à 1 $g.L^{-1}$ de chaque AGV (acide acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalerique et caproique).

4.3.2.3 Demande chimique en oxygène

La mesure de la DCO (demande chimique en oxygène) de fractions liquide a été réalisée par des kits Spectroquant®. La méthode repose sur une oxydation de la matière organique d'un échantillon par du dichromate de potassium en milieu acide et en présence d'un catalyseur (sulfate d'argent) (APHA, 1995). Le dosage des ions Cr^{3+} résiduaires par spectrophotométrie permet la détermination de la DCO des échantillons. Cette méthode n'est pas applicable aux échantillons solides car leur oxydation est incomplète (Buffière *et al.*, 2006).

4.3.2.4 Azote ammoniacale

L'azote ammoniacal (NH_4^+) est analysé à l'aide d'un distillateur/titrateur BUCHI 370-K. L'ammoniaque des échantillons est alcalinisé puis distillé. Il est alors recueilli dans une solution d'acide borique où un ajout d'acide chlorhydrique (0,02 N) permet la titration.

4.3.2.5 Phénols

Les phénols totaux contenus dans les phases solubles des échantillons ont été dosés par spectrophotométrie (Boizot & Charpentier, 2006). La méthode consiste à oxyder les composés phénolés par un réactif de Folin-Ciocalteu en présence de carbonate de sodium en microplaques (Microtest™ 96, Falcon®). La coloration bleu de la solution est proportionnelle à la concentration en composés phénolés. L'absorbance à 735 nm, longueur d'onde caractéristique des polyphénols, est mesurée sur un spectrophotomètre (NanoQuant, Tecan). Une gamme d'étalonnage est systématiquement réalisée et les résultats sont exprimés en acide gallique équivalent.

4.3.3 PHASE SOLIDE

4.3.3.1 Dosage des fibres selon Van Soest

La méthode de Van Soest est la méthode de référence pour le dosage des fibres (Soest, 1963). La technique repose sur une solubilisation progressive du tissu lignocellulosique. La masse des résidus permet de déterminer les quantités de matières solubilisées (Figure 4-12). La méthode permet d'estimer les teneurs en composés solubles, hémicelluloses, cellulose, lignines et cendres.

Ce protocole a été modifié afin de caractériser plus finement la fraction soluble, par l'ajout d'un prélavage à l'eau déminéralisée. Pour obtenir la fraction soluble à l'eau, l'échantillon est d'abord lavé à l'eau déminéralisée durant 30 minutes sous ébullition afin de séparer les sucres solubles, certains minéraux, et les particules fines du substrat. La réaction avec le détergent neutre (NDF) se fait durant 1 heure à ébullition et permet d'extraire la fraction soluble au détergent. Cette solution contient un agent tensioactif permettant la solubilisation des pectines, des protéines, des lipides. Le nettoyage à l'eau et au NDF forme la fraction soluble selon Van Soest (Soest, 1963).

L'extraction des hémicelluloses est réalisée par l'ajout d'un détergent acide (ADF) durant 1 heure sous ébullition. La quatrième extraction (ADL) consiste à séparer la cellulose du résidu par action d'acide sulfurique à 72% durant 3 heures à température ambiante. Pour finir, l'échantillon est calciné afin de volatiliser la matière organique résiduaire (lignines principalement). Il ne reste donc que des minéraux en fin d'analyse. Le résidu solide de chaque extraction est pesé après séchage à 105°C pendant une nuit. Un bilan massique permet d'estimer la proportion de chaque fraction dans l'échantillon. Deux systèmes de dosage des fibres ont été utilisés durant la thèse. Le premier est un système fiberbag 6

postes (Gerhardt). Ce système laissant passer les particules d'une taille inférieure à 120 µm, il a été remplacé en fin de thèse par un autre système plus précis (porosité de 40 µm). Cette unité d'extraction automatisée FIWE à 6 postes (VELP Scientifica®).

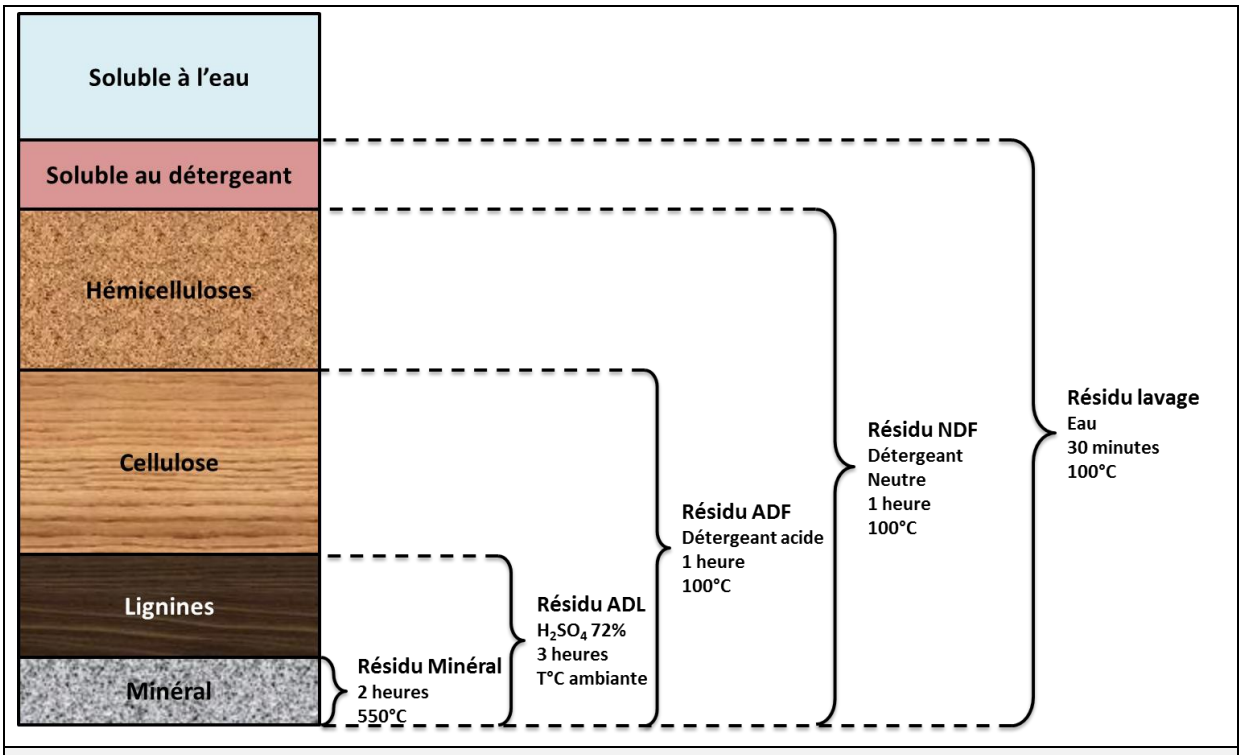


Figure 4-12 : Fractionnement des tissus lignocellulosiques selon Van Soest.

4.3.3.2 Dosage des sucres

Le dosage des sucres pariétaux et des lignines a été réalisé selon deux protocoles d'extraction successifs. Le dosage permet de mesurer la quantité de polysaccharides pariétaux ainsi qu'une fraction lignine dite « klason ». Cependant, la valeur obtenue selon ce protocole est toujours supérieure à celle retrouvée avec le protocole Van Soest (Hatfield & Fukushima, 2005). Pour cette raison, la cellulose, les hémicelluloses et les lignines considérées durant la thèse sont déterminés selon le dosage des fibres et non selon celui des sucres.

Les deux extractions reposent sur une hydrolyse acide (H_2SO_4) de la matrice lignocellulosique en deux étapes. Ils varient uniquement par les quantités d'échantillons, les concentrations en acide sulfurique, les températures et les temps de réaction. Le premier protocole (Monties *et al.*, 1984) consiste en l'hydrolyse de 300 mg d'échantillon à 12 M d'acide sulfurique durant 2 heures à température ambiante, suivi d'une hydrolyse durant 3 heures à 100°C après dilution à 1,5 M. Le second protocole, émis par le NREL (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al.*, 2012), consiste à hydrolyser 100 mg d'échantillon à 12 M d'acide sulfurique durant 1 heure à 30°C, suivi d'une seconde hydrolyse diluée à 4 M acide) durant 1 heure à 120°C.

Quel que soit le protocole d'extraction, les hydrolysats sont filtrés sur un filtre en fibres de verre à 0,7 µm de porosité (GF/F, Whatman) après refroidissement. Les filtrats sont conservés, tandis que les filtres sont rincés avec 50 mL d'eau osmosée puis séchés une nuit à 105°C. Après pesée, les filtres sont calcinés à 550°C durant 2 heures puis repesés. La masse de matières organiques sur le filtre indique la masse de lignines klason de l'échantillon. Durant ce temps, les filtrats sont filtrés sur des filtres « seringue » en nylon de 0,2 µm de porosité (Acrodisc®). Ils sont alors transférés dans des flacons pour HPLC fermés hermétiquement. L'HPLC est constituée d'un passeur automatique d'échantillons (Water 717 plus), d'une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-rad) pour filtrer les résidus éventuels, ainsi que d'une colonne Aminex HPX-87H (300 mm sur 7,8 mm, 50°C, Biorad). L'éluant est une solution d'acide sulfurique à 0,005 M à un débit de 0,3 $mL.min^{-1}$. Une calibration préalable de l'HPLC a été réalisée pour l'analyse du : glucose, xylose, arabinose, acides uroniques (galacturonique et gluconique).

4.3.3.3 Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier consiste à mesurer l'absorption d'un rayonnement infrarouge par un échantillon. La détection de vibrations (longueur d'ondes) caractéristiques de certaines liaisons chimiques permet une analyse qualitative de la composition d'un échantillon. Cette méthode est particulièrement intéressante pour la comparaison d'échantillon. Sa rapidité et son caractère non destructif ont permis de substituer cette analyse au dosage des fibres. Les spectres infra-rouges sont mesurés par un spectromètre Nicolet iS10 FT-IR (Thermo-scientific) équipé d'un module Smart iTR (diamant). L'enregistrement des spectres est moyenné sur 16 scans, avec une résolution de 4 cm^{-1} sur des longueurs d'ondes de 4000 à 600 cm^{-1}. Le logiciel Omnic (version 9.1) a été utilisé pour l'acquisition et la quantification des pics caractéristiques de la lignocellulose (Tableau 4-1).

Longueur d'onde (cm^{-1})	Liaison chimique	Polymères caractérisés
898	C-H déformation → la cellulose amorphe	Cellulose
1375	C-H déformation → la cellulose et les hémicelluloses	Cellulose et hémicelluloses
1512	C=C → le squelette aromatique des lignines	Lignines
1730	C=O → le xylose	Hémicelluloses

Tableau 4-1 : Longueurs d'ondes d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier. Ces longueurs d'onde correspondent à des vibrations caractéristiques de la présence de composés lignocellulosiques. (Yang *et al.*, 2009; da Costa Lopes *et al.*, 2013)

4.3.3.4 Dosage du carbone et de l'azote

Le dosage du carbone total des échantillons est réalisé par un analyseur de carbone organique total (TOC-V CHS/CSN, Shimadzu corporation). La méthode repose sur une

combustion de l'échantillon à 680°C avec un catalyseur (cobalt/platine) en présence d'oxygène pur. Le CO_2 ainsi libéré est dosé par un détecteur infrarouge non-dispersif.

L'azote total est déterminé selon la méthode de Kjeldhal. L'échantillon est tout d'abord minéralisé en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4, 96%) et d'un catalyseur (catalyseur de Kjeldhal) durant 3 heures. L'azote est ainsi transformé en ions ammonium (NH_4^+). Cet azote est alors dosé sur un distillateur/titrateur BUCHI 370-K. L'ammonium des échantillons est alcalinisé puis distillé. Il est alors recueilli dans une solution d'acide borique où un ajout d'acide chlorhydrique (0,02 N) permet la titration.

4.4 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES ET OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

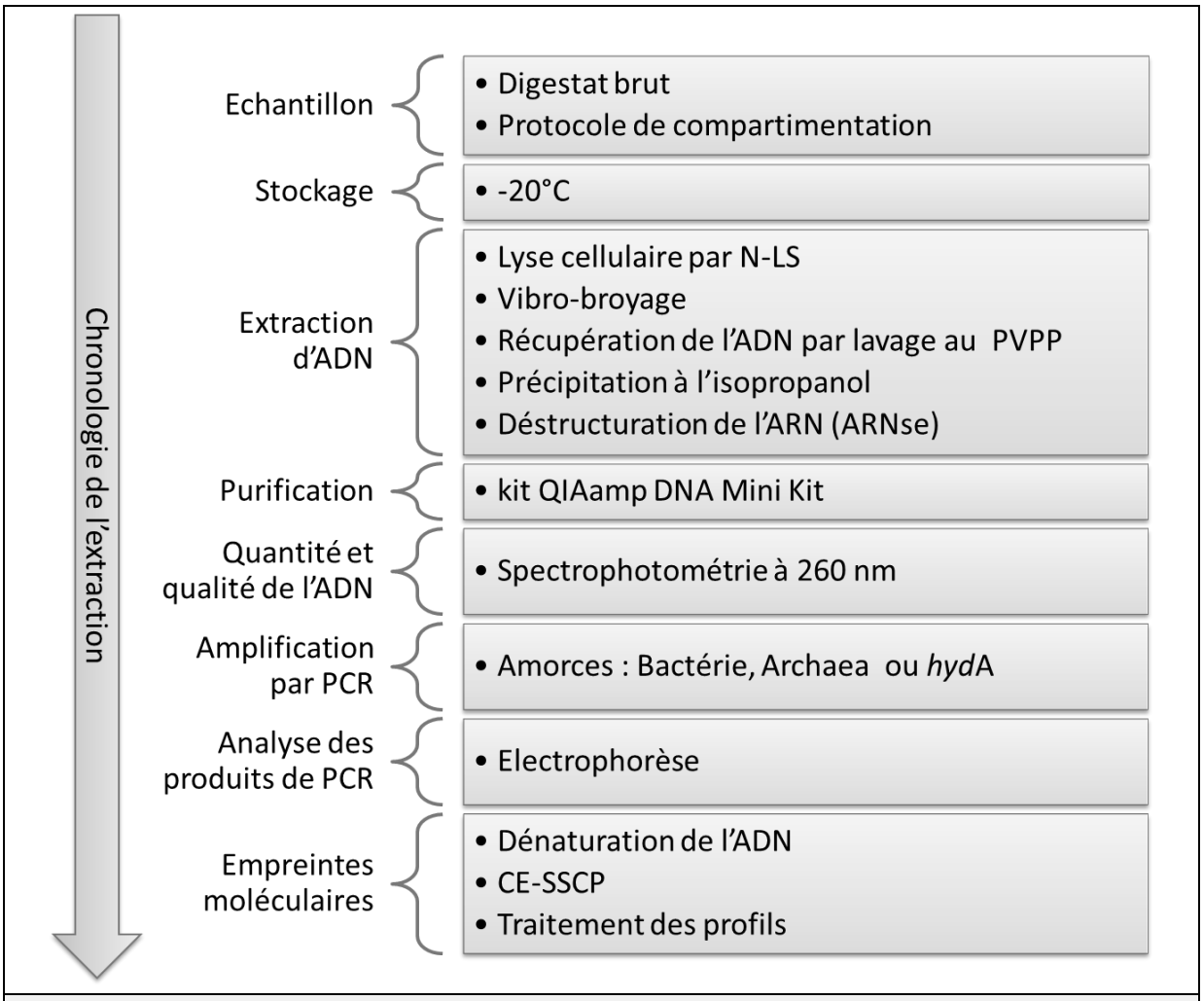


Figure 4-13 : Procédure pour l'analyse des communautés microbiennes des échantillons.

L'analyse des communautés microbiennes d'un digestat permet de répondre à plusieurs questionnements liés à la biomasse microbienne. Les outils employés durant cette thèse (empreintes moléculaires et séquençages) visent à étudier les communautés microbiennes dans leur ensemble pour expliquer l'influence des paramètres de procédé sur l'écosystème de digestion anaérobie. Il est ainsi possible de relier les performances de procédés aux micro-organismes et réciproquement. L'objectif est alors d'identifier les micro-organismes et les conditions environnementales les plus propices à la dégradation efficace du substrat. Cependant, la dégradation de substrats dégradables et hétérogènes, rend importante la notion de spatialisation des communautés microbiennes. Un protocole de compartimentation de la biomasse microbienne a donc été développé dans l'objectif d'apporter des éléments de réponse sur le lien entre les paramètres de procédé et la localisation des micro-organismes sur le support. Enfin, il est possible de recourir aux

observations microscopiques afin de répondre à des questionnements liés à la dégradation du support.

4.4.1 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Des outils de biologie moléculaire ont été employés pour étudier les communautés microbiennes au cours des différentes expériences. Ces outils ont notamment permis d'étudier l'évolution dynamique des communautés microbiennes sous l'angle de la diversité, de la compartimentation ou de la croissance microbienne. Plusieurs étapes consécutives sont requises pour l'obtention de l'empreinte moléculaire d'une communauté microbienne (Figure 4-13) : extraction, amplification et empreinte moléculaire.

4.4.1.1 Echantillonnage, extraction et purification de l'ADN

Après prélèvement, les échantillons ont été introduits dans des tubes eppendorf® à vis de 2 mL préalablement stérilisés. La masse précise d'échantillon (< 500 mg) est notée avant congélation à -20°C. L'échantillon peut rester ainsi stocké plusieurs mois avant extraction de l'ADN.

L'extraction consiste en une lyse enzymatique et mécanique des cellules microbiennes suivie d'une purification (Rousselon, Delgenès & Godon, 2004). Tout d'abord, 500 µL tampon phosphate à pH 8 contenant 5% de N-Lauroyl sarcosine (N-LS) sont ajouté à l'échantillon congelé et suivi d'une incubation durant 1 heure à 70°C. Après refroidissement rapide, 500 µL de billes de zirconium sont ajoutées dans le tube et le tout est agité dans un vibro-broyeur durant 10 minutes. Enfin, 15 mg de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) sont ajoutés pour fixer les inhibiteurs de la PCR (acides humiques). L'échantillon est alors vortexé puis centrifugé et le surnageant, contenant l'ADN, est récupéré. Les billes sont alors lavées par trois cycles de lavages/centrifugation avec 500 µL d'une solution TENP (Tris-Cl, 50 mM ; EDTA, 20 mM ; NaCl, 100 mM ; PVPP, 1%). Les surnageants successifs sont de nouveaux centrifugés pour éliminer les suspensions. L'ajout d'un volume d'isopropanol permet de précipiter l'ADN, qui est ensuite récupéré par centrifugation. L'ajout de 20 µL d'une solution à 1 $mg.mL^{-1}$ de RNAse suivi de 10 minutes d'incubation à 37°C permet de déstructurer l'ARN ne conservant ainsi que l'ADN. La purification finale de l'ADN repose sur l'utilisation d'un kit commercial de purification d'ADN (kit QIAamp DNA Mini Kit). Après purification, la quantité et la pureté de l'ADN sont mesurées par l'absorbance à 260 nm sur un Infinite M200 Reader (NanoQuant, Tecan), tandis que les contaminants (protéines et acides humiques) sont mesurés à 280 nm.

4.4.1.2 Amplification de l'ADN

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant de dupliquer en grand nombre une zone spécifique de l'ADN ou de l'ARN. Une amorce synthétique spécifique du gène à amplifier est utilisée en association avec une ADN polymérase

thermorésistante et un cocktail de nucléotide. Ici, la région V3 de l'ADNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces W49 et W104 pour les bactéries, W274 et W275 pour les *Archaea*, ainsi que *hyd*AClosF et *hyd*AClosR pour le gène encodant la production de hydrogénase [Fe-Fe] (*hyd*A, micro-organismes producteur d'hydrogènes) (Tableau 4-2). Les amorces sont marquées par une molécule fluorescente pour leur détection ultérieure. Chaque solution d'amplification contient : 0,5 µM de chaque amorce, 1 µL d'ADN purifié (0,5 µL pour les *Archaea*), 5 µL de tampon 10x Pfu Turbo, 0,5 µL d'ADN polymérase Pfu Turbo (Stratagene), 200 µM pour chaque nucléotide, de l'eau ultra pure (MDP Lavoisier, France) pour ajuster le mélange à 50 µL. L'amplification repose sur des cycles de dénaturation-hybridation-élongation réalisés sur un Mastercycler epgradient S (Ependorf) de la façon suivante :

- Bactéries : dénaturation initiale à 94°C durant 2 minutes, 25 cycles de dénaturation (30 s à 94°C), hybridation (30 s à 51°C) et élongation (30 s à 72°C), élongation finale à 72°C durant 10 minutes.
- *Archaea* : dénaturation initiale à 94°C durant 2 minutes, 30 cycles de dénaturation (30 s à 94°C), hybridation (30 s à 61°C) et élongation (30 s à 72°C), élongation finale à 72°C durant 10 minutes.
- *hyd*A : dénaturation initiale à 94°C durant 2 minutes, 35 cycles de dénaturation (30 s à 94°C), hybridation (30 s à 57°C) et élongation (30 s à 72°C), élongation finale à 72°C durant 10 minutes.

Enfin, la taille et la pureté des produits de PCR sont analysées par électrophorèse via un bioanalyseur Agilent 2100 selon les recommandations du constructeur.

Cible	Noms des amorces	Séquences	Position	Référence
Bactérie	W49	5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'	*E. coli* - 330	(Delbès *et al.*, 2001)
	W104	5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	*E. coli* - 533	
Archaea	W274	5'- CCCTACGGGGCGCAGCAG -3'	*E. coli* - 340	(Ovreås *et al.*, 1997)
	W275	5'- 6FAM- TTACCGCGGCGGCTG - 3'	*E. coli* - 519	
*hyd*A	*hyd*AClosF	5'-ACCGGTGGAGTTATGGAAGC-3'	*C. pasteurianum* - 1258	(Quéméneur *et al.*, 2011)
	*hyd*AClosR	5'-CATCCACCTGGACATGCCAT-3'	*C. pasteurianum* - 1508	

Tableau 4-2 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

4.4.1.3 Empreinte moléculaire

L'empreinte moléculaire d'un écosystème microbien est obtenue par CE-SSCP (Capillary Electrophoresis - Single-Strand Conformation Polymorphism). Brièvement, la

méthode repose sur la différence de conformation des simples brins d'ADN qui modifie sa vitesse de migration sur une électrophorèse. La fluorescence contenue au niveau des amorces est détectée en sortie et trace un profil correspondant à l'empreinte moléculaire de l'échantillon. Puisque la surface d'un pic est proportionnelle à l'ADN détectée, il est possible d'évaluer l'abondance relative d'un pic vis à vis de l'écosystème de l'échantillon. Pour réaliser ce profil, 1 mL d'ADN amplifié (dilué) est mélangé dans une solution contenant 18,8 mL de formamide et 0,2 ml de standard interne ROX (GeneScan, Applied Biosystems) puis dénaturé à 95°C pendant 5 minutes. La CE–SSCP est effectuée sur un ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). L'entrainement est réalisé par un polymère (GeneScan polymer, Applied Biosystems) sur un capillaire (47 cm sur 50 µm) jusqu'à un détecteur laser. Les données sont obtenues via le logiciel GeneScan (Applied Biosystems), puis analysées par le package StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009) sur la version 2.15.1 de R (Team, 2008).

Enfin, à partir de l'analyse des profils SSCP, les échantillons pertinents ont été pyroséquencés pour identifier les micro-organismes en présence. Cette analyse a été réalisée par un laboratoire externe dans le cadre d'une prestation de service (Molecular Research Laboratory, USA).

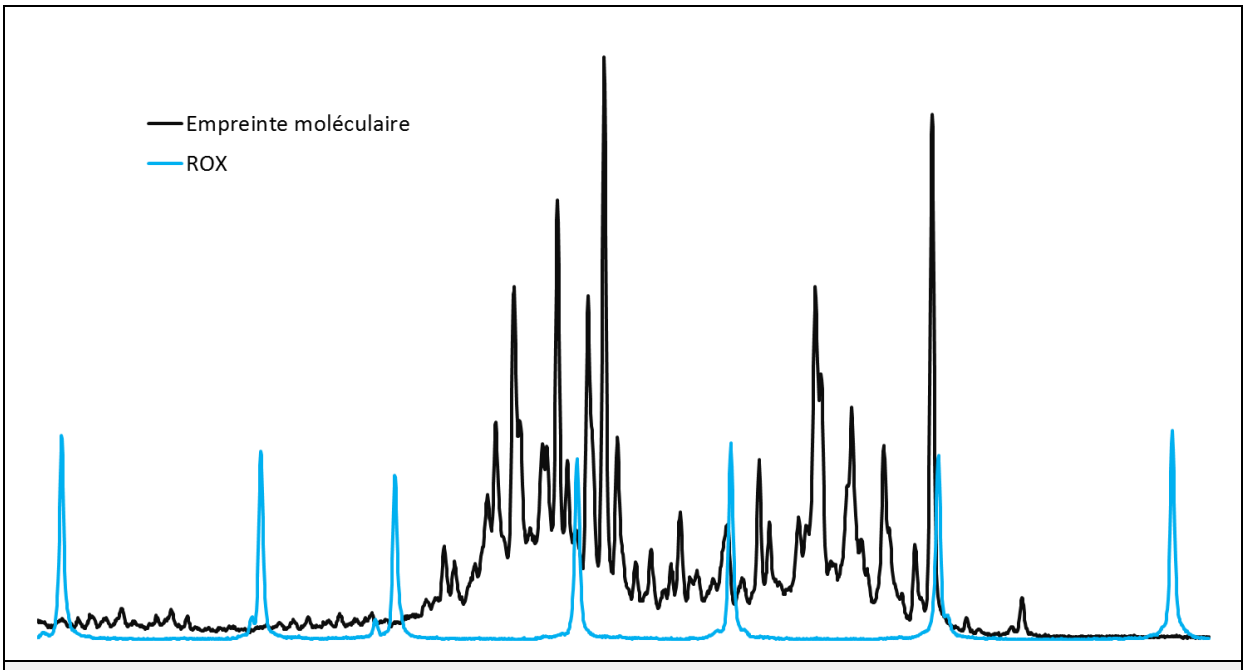


Figure 4-14 : Exemple d'empreinte moléculaire.
L'alignement des pics est assuré par des standards internes (ROX).

4.4.2 PROTOCOLE DE COMPARTIMENTATION

L'idée de compartimenter la biomasse microbienne en fonction de son degré d'adhésion (ou d'affinité) au support est une stratégie d'étude référencée dans la littérature pour les supports dégradables (Zhang *et al.*, 2007b; Jensen *et al.*, 2008). Cependant, les

méthodologies employées peuvent être très complexes puisqu'elles reposent sur une séparation entre la phase liquide et solide des échantillons, moyennant le recours à des centrifugations et diverses solutions tampons permettant le détachement des micro-organismes. Ces méthodes n'ayant pas donné de résultats satisfaisants sur les digestats au cours de la thèse, une méthode alternative a été développée.

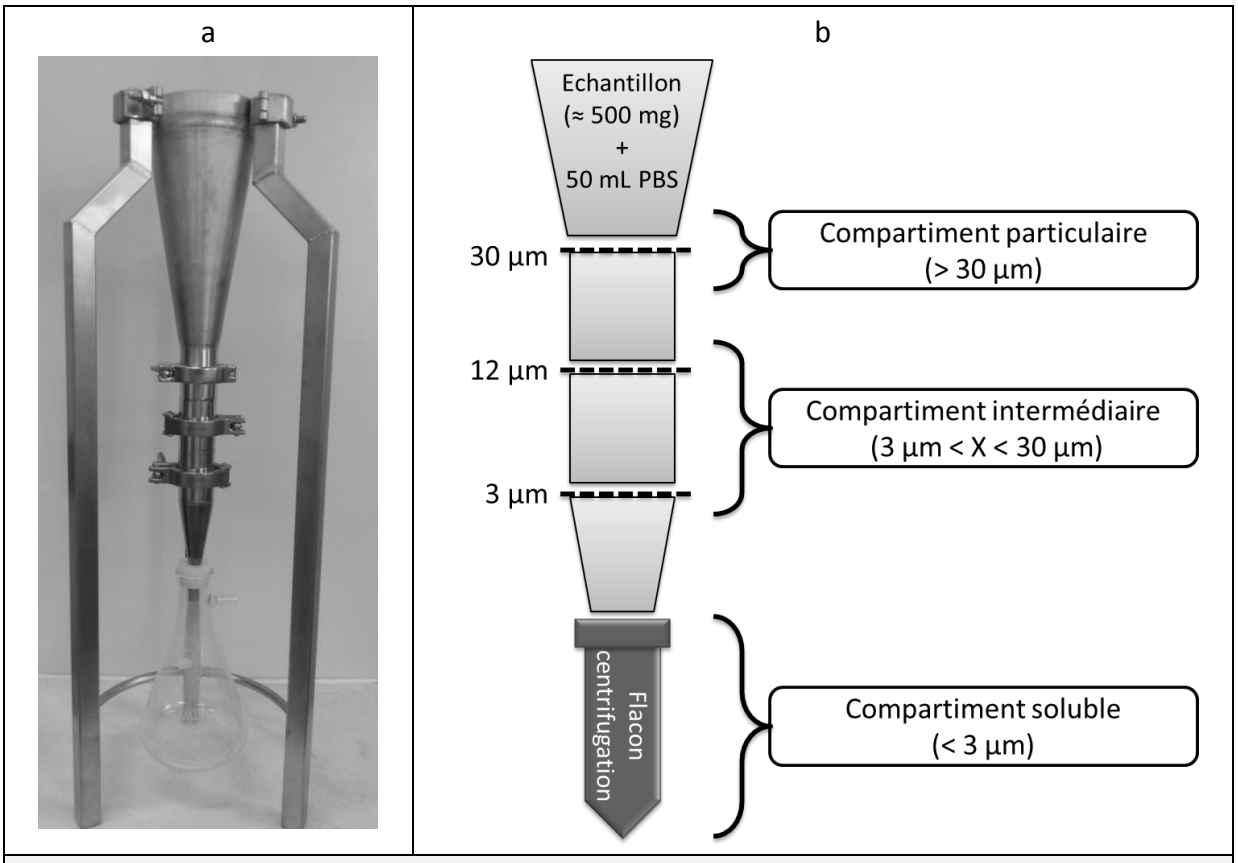


Figure 4-15 : Protocole de compartimentation microbienne.
(a) Photo de l'installation. (b) Design du protocole.

4.4.2.1 Mode opératoire

La paille digérée ou non est une biomasse moins dense que l'eau. Par conséquent, plutôt qu'une centrifugation, une séparation par filtration a été retenue pour réaliser la compartimentation. Une colonne de filtration étagée a permis cette séparation en manipulant le moins possible les échantillons (Figure 4-15-a). Cette colonne peut contenir jusqu'à trois filtres. La compartimentation est réalisée à partir de 500 mg d'échantillons frais conditionnés dans un tube de 10 mL à vis. Un tampon phosphate salin (PBS, «Phosphate Buffered Saline ») a été choisi pour sa neutralité évitant ainsi les chocs osmotiques au niveau des cellules. L'échantillon est mis en contact avec 9 mL de tampon PBS puis vortexé durant 30 s avant d'être déposé sur le premier filtre positionné en tête de colonne. Ensuite, deux lavages successifs du tube sont réalisés avec 10 mL de tampon pour récupérer toute la biomasse microbienne. Après une première filtration, les 20 mL restants sont ajoutés pour rincer les filtres.

Les seuils de coupure des filtres, leur matériau et leur nombre ont été ajustés en fonction des fractions désirées et de la filtrabilité des échantillons (Figure 4-15-b). Cette mise au point du procédé a nécessitée plusieurs mois d'essais et a été réalisée sur des digestats produit durant cette thèse. Ainsi, un premier filtre en nylon à 30 µm permet l'obtention de la fraction particulaire en retenant les particules de granulométrie supérieure à 30 µm (pailles et micro-organismes associés). Ce filtre n'étant pas disponible sur le marché, il est découpé dans une toile de nylon puis stérilisé à l'alcool avant usage. Ensuite, deux filtres en polycarbonate (Nuclepore™ track-etched, Whatman®) de 12 et 3 µm sont utilisés : les gâteaux recueillis sur ces filtres sont rassemblés pour former une fraction intermédiaire contenant les particules et les micro-organismes associés compris entre 3 et 30 µm. Enfin, le filtrat est récupéré dans un tube de centrifugation de 50 mL, centrifugé puis le culot est repris dans un tube eppendorf de 2 mL. Ce culot contient les particules ayant une granulométrie inférieure à 3 µm et correspond à la fraction soluble du digestat.

Ces échantillons sont conditionnés dans des tubes eppendorf de 2 mL stériles. Un raclage du filtre à 30 µm permet d'obtenir le compartiment particulaire, les filtres du compartiment intermédiaire (12 et 3 µm) sont pliés et introduits dans les tubes, tandis que le culot du compartiment soluble est conservé. Tous ces échantillons sont ensuite congelés à -20°C pour analyse.

4.4.3 OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Les observations au microscope électronique à transmission (MET) ont été réalisées par Françoise Watteau du Laboratoire Sol et Environnement (LES) de l'université de Loraine. Les digestats ont été envoyés frais mais non congelés avec une réception par le LES dans les 24 heures. Ces échantillons ont été traités immédiatement après réception. Chaque échantillon est tout d'abord observé à la loupe afin d'identifier les fractions majoritaires et représentatives de l'échantillon. Ainsi, trois types de fraction ont été retenus et suivis : les entre-nœuds (fraction majoritaire de la paille non dégradée à t0), les feuilles (fraction pré-dégradée par des champignons) et nœuds/glumes (fraction hautement lignifiée). Pour chaque digestat, chaque fraction ont été récupérée en 5 réplicas et préparée pour analyse au MET (Watteau & Villemin, 2011).

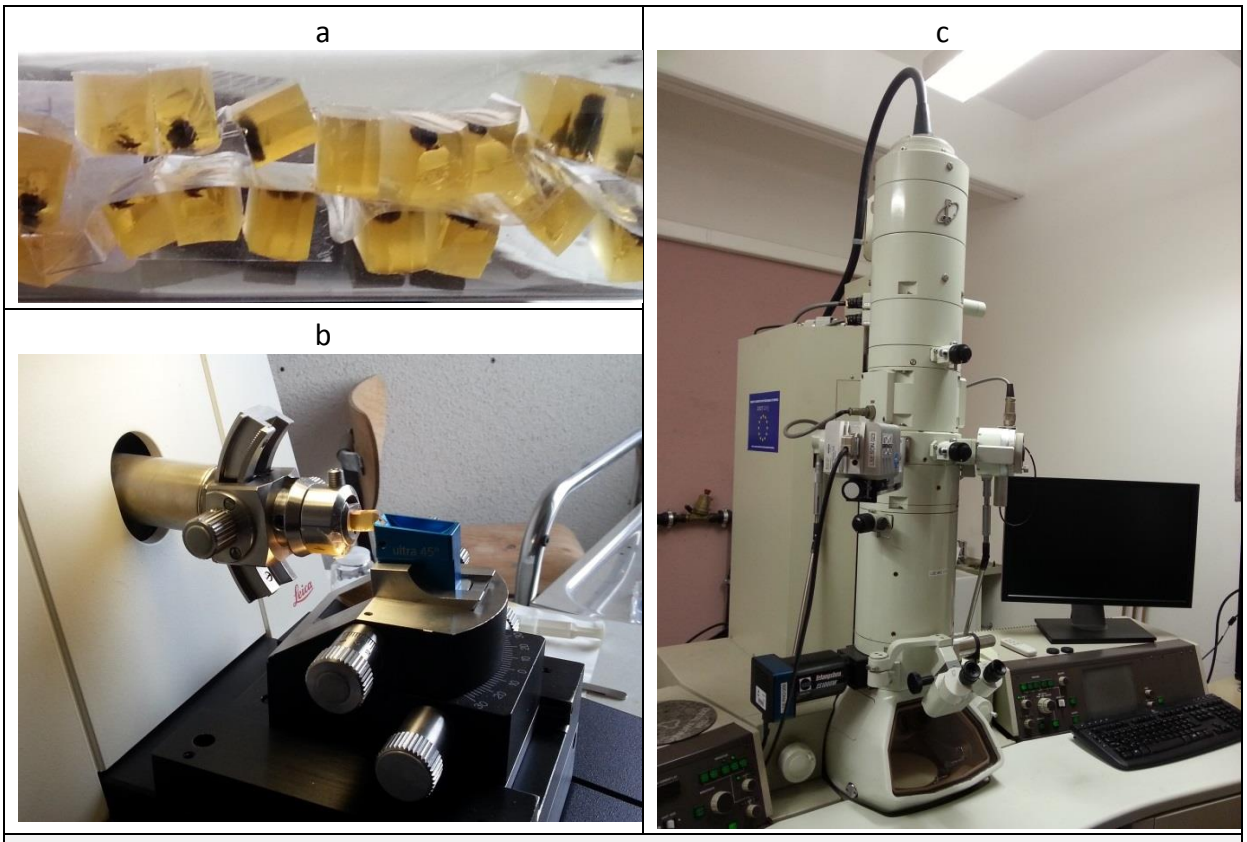


Figure 4-16 : Microscopie électronique à transmission.
(a) Echantillons inclus dans une résine époxy. (b) Découpage à l'ultramicrotome.
(c) Microscope électronique à transmission.

Environ 1 mm^3 de chaque échantillon est moulé dans une gélose afin de maintenir la structure des minéraux lors des étapes de préparation (silice en particulier). Un tampon cacodylate est ajouté et permet de maintenir la structure de la matière organique. Ce tampon est évacué par filtration sous vide, puis l'échantillon est fixé à l'aide de tétroxyde d'osmium (2% w/v, pH 7,2 durant 1 heure). Ce très fort oxydant permet d'améliorer le contraste de l'image. L'échantillon est rincé par plusieurs bains d'acétone possédant des concentrations croissances. La solidification de l'échantillon est réalisée par inclusion dans une résine époxy (Polarbed 812). Cette étape est réalisée en trois ajouts successifs de résine espacée d'une nuit. Les échantillons sont ensuite moulés avant découpe des sections. Les coupes semi-fines (0,35 µm) ou ultrafines (70 à 90 nm d'épaisseur) ont été réalisées avec un ultramicrotome (Leica Ultracut S) muni d'un couteau en diamant. Après coloration à l'acide uranyle et au citrate de plomb, les coupes ont été observées au microscope électronique à transmission (Philips CM12) fonctionnant à 80 kV.

4.5 ANALYSES STATISTIQUES

Plusieurs outils ou approches statistiques ont été utilisées durant la thèse pour concevoir les expérimentations et s'assurer de la fiabilité des résultats.

4.5.1 PLAN D'EXPÉRIENCE

La méthodologie des plans d'expériences est employée pour le design d'une expérimentation. Cette méthodologie permet de réduire le nombre d'essais expérimentaux tout en assurant l'obtention d'un maximum d'information via une modélisation de la réponse du système. Dans cet objectif, un plan à surface de réponse (Box-Behnken) a été réalisé. L'analyse statique et dynamique des réponses du système (production de méthane ou d'AGV et le pH final) a été réalisée sous MATLAB® (Version 7.11.0.584, R2010b). L'analyse des indicateurs statistiques a notamment portée sur le coefficient de détermination (R^2) et la valeur critique du test de Fischer (p-value) du modèle global ainsi que celles de chaque constante du modèle (p-value individuels).

4.5.2 ANALYSE DE VARIANCE

La majorité des analyses de variances (ANOVA) ont été réalisées via le logiciel R (version 2.15.1; (Team, 2008)) et sa librairie Rcmdr (version 1.8.4.). Les seuils de significativité ont été fixés à 5%, puis représentés par les indices suivants : p-value < 0.0005 "***", < 0.005 "**", < 0.05 "*" et > 0.05 "ns".

4.5.3 ANALYSE EN COMPOSANTS PRINCIPALES

Enfin, plusieurs résultats ont été présentés sous la forme d'analyse en composants principales (ACP). Cette méthode d'analyse de données permet de représenter un grand nombre de variables corrélées selon un nombre réduit de variables décorrélées. Une représentation sous forme de nuage de points distribués sur deux axes principaux est ainsi régulièrement utilisée. Plusieurs logiciels ont été employés selon les expérimentations et l'avancement dans la thèse. Ainsi, le logiciel XLSTAT Version 2013.4.03 (Addinsoft, New York, NY) a été utilisé pour l'étude de l'effet de la morphologie sur la digestion anaérobie. Le logiciel R (version 2.15.1; (Team, 2008)) et sa librairie *vegan* ont été utilisés notamment pour l'analyse des profils CE-SCCP.

5 RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 IDENTIFICATION DES PARAMÈTRES CLÉS

Ce chapitre vise à identifier les principaux paramètres de la méthanisation sèche discontinue de la paille de blé pour maximiser les performances de dégradation : substrat, inoculum et paramètre de procédé. Tout d'abord, la caractérisation du substrat modèle ainsi que l'évaluation de son potentiel énergétique (méthane et hydrogène) ont été évaluées, en tenant compte de ses variabilités morphologiques (tiges, feuilles, épis). L'influence de la taille des particules retenues durant cette thèse sur le potentiel méthane de la paille a également été évaluée. Ensuite, l'influence et l'interaction entre plusieurs paramètres clés de la digestion sèche discontinue ont été déterminées : teneur en matières sèches, taux d'inoculation et taille des particules. Grâce à la méthodologie des plans d'expériences, une évaluation dynamique de la réponse du système a permis de mettre en évidence une évolution de l'importance des paramètres de procédé au fil de l'avancement de la réaction biologique. Les principaux résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'une publication soumise dans le journal « Industrial crops and products » et d'une autre publiée dans « Bioresource Technology ».

5.1.1 AVANT-PROPOS DU CHAPITRE 5.1

Une stratégie particulière, liée à l'usage d'un faible taux d'inoculation, a notamment été établie dans le cadre de cette thèse. Cette stratégie requiert donc une maitrise suffisante des paramètres de procédé pour assurer une dégradation efficace de la lignocellulose. L'étude de la bibliographie (synthèse bibliographique) indique que trois catégories de paramètres doivent être prises en compte : la biomasse microbienne, le substrat et les paramètres de procédé. La compréhension de l'influence des paramètres de procédé sur l'écosystème de digestion sèche est donc un prérequis pour l'étude.

5.1.1.1 Hétérogénéité du substrat

La paille de blé est retenue pour cette étude en tant que modèle des résidus agricoles. Ce substrat présente des hétérogénéités multi-échelles qui impactent sa biodégradation (synthèse bibliographique). En effet, les hétérogénéités morphologiques de la paille (teneurs en tiges, feuilles et épis) induisent des hétérogénéités spatiales au sein du milieu. Ces hétérogénéités sont très importantes en voie sèche, puisque les faibles teneurs en eaux réduisent les possibilités de propagation des micro-organismes sur le substrat (Martin, 2001; Pommier *et al.*, 2007). Ainsi, la structure morphologique hétérogène de la paille peut augmenter les hétérogénéités au sein des milieux secs, comme c'est le cas pour les ordures ménagères (Staley *et al.*, 2011) ou la dégradation dans les sols (Giacomini *et al.*, 2007). En digestion anaérobie, l'impact des hétérogénéités morphologiques est très peu référencé. Pourtant ces effets ont été mis en évidence lors de la biodégradation des pailles en tant que fourrage (Bhargava, Ørskov & Walli, 1988) ou lors de la dégradation dans les sols (Harper & Lynch, 1981; Bertrand *et al.*, 2006). Ces études montrent une forte dégradation des feuilles et la faible dégradation des tiges dans ces écosystèmes. Par contre, un effet significatif de la morphologie des résidus de la culture de la banane a été mis en évidence (Kamdem *et al.*, 2013). Egalement, une étude sur la paille de sorgho a constaté que l'efficacité des attaques enzymatiques varie en fonction des tissus morphologiques (Vandenbrink *et al.*, 2013) .

Pour mieux appréhender l'effet de la variabilité du substrat en digestion anaérobie, la paille de blé a été finement caractérisée en tenant compte des différentes fractions morphologiques qui la constituent. La paille étant exempte de racines et de grains, cinq fractions ont été retenues (Silva, Rouau & Stéphane, 2011): les entre-nœuds, les feuilles, les nœuds, les glumes et les rachis. Ces fractions morphologiques ont été analysées pour caractériser le tissu lignocellulosique et déterminer le potentiel énergétique (méthane et hydrogène). Simultanément, une sixième fraction a été reconstituée à partir de la distribution morphologique de la paille et a servi de témoin dans toutes les caractérisations. Puisque les différences attendues entre fraction morphologique étaient faibles, six réplicats ont été réalisés pour toutes les caractérisations par rigueur statistique. Ces résultats sont présentés dans la section 5.1.2.

L'une des façons de réduire les hétérogénéités d'un milieu consiste en un ajustement de la taille des particules (Gy, 1992). En effet, les broyages fins sont aptes à fragmenter les cellules végétales, pour permettre l'accès à l'intérieur de chacune d'entre elles (synthèse bibliographique). Ces prétraitements mécanique permettent la solubilisation des sucres des substrats, l'augmentation des surfaces accessibles et la réduction de la cristallinité de la cellulose (Barakat *et al.*, 2013). Leur application est toutefois limitée par les consommations énergétiques importantes. Trois broyages, correspondant à trois tailles de particules, ont été élaborés dans le but de trouver l'optimum de granulométrie sur la biologie : broyage fin, moyen et grossier. Une caractérisation de ces trois granulométries a donc été réalisée et permet de dresser un profil type de la paille de blé de la thèse, où la granulométrie moyenne a été retenue comme référence.

5.1.1.2 Interaction entre paramètres de procédé

Le paramètre de procédé principal en digestion sèche semble être la teneur en matières sèches (Le Hyaric *et al.*, 2011), par un effet important sur les performances du procédé (Forster-Carneiro *et al.*, 2008). La littérature analysant l'effet de la teneur en matières sèches sur la digestion anaérobie repose sur l'étude d'une large gamme de siccité allant de la voie humide (10% MS) à la voie sèche (35% MS) (Le Hyaric *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Cette approche met en évidence une transition entre la voie humide et la voie sèche, sans toutefois préciser les phénomènes impliqués à ce niveau. En effet, la voie sèche implique des phénomènes physiques (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Bollon *et al.*, 2013), chimiques (Kristensen *et al.*, 2008) ou biologiques (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013), qui influent globalement sur les performances du procédé. Aussi, l'étude d'une gamme plus restreinte allant de la voie semi-sèche à la voie sèche semble manquer dans la littérature.

Au démarrage de la réaction, la transformation initiale de la phase soluble est liée à la composition et la quantité de micro-organismes présents. Cette biomasse microbienne est directement dépendante du taux d'inoculation. Celui-ci est généralement défini par le ratio S/X, correspondant au ratio entre la quantité de MV du substrat (S) et celle de l'inoculum (X). La stratégie principale de cette thèse consiste en de faibles inoculations : S/X > 15 contre 1 à 5 dans les études de laboratoire (Brown *et al.*, 2012; Liew *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012). Ces faibles inoculations ralentissent les cinétiques réactionnelles et impactent la diversité microbienne (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Cette approche permet de sélectionner les communautés microbiennes les plus adaptées aux conditions environnementales de l'expérience et de découpler les différentes phases de la réaction pour mieux les étudier individuellement : adaptation, production non limitée, stabilisation. En contrepartie, les risques d'acidification des digesteurs sont considérablement accrus. Cependant, bien que ponctuellement employée dans la littérature (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012), l'effet des faibles inoculations est peu maitrisé.

Trois paramètres (facteurs) ont été donc identifiés comme critiques pour l'obtention d'un procédé efficace à la dégradation de la paille en conditions sèches : la teneur en eau, la taille des particules et le taux d'inoculation. Un plan d'expérience a été employé pour limiter le nombre d'expérimentations. En effet, les plans d'expériences permettent de modéliser, par régression multilinéaire, les points expérimentaux du domaine d'étude qui n'ont pas été testés physiquement (Goupy, 2000). Ils permettent également d'étudier l'interaction entre plusieurs paramètres. Typiquement, les plans d'expérience sont utilisés pour l'optimisation d'un procédé par l'identification des paramètres influant (plan de screening), des conditions optimales de fonctionnement (plan d'optimisation) ou d'un mélange optimal en codigestion par exemple (plan de mélange) (Wang & Wan, 2009). Ici, chacun les trois facteurs et leurs interactions ont été étudiés grâce à un plan de Box-Behnken à trois niveaux. Le plan retenu n'est pas centré sur les conditions optimales de fonctionnement de chaque paramètre, mais sur la zone critique (défavorable) où le système tend vers une acidification ou une baisse des performances. Ainsi, la teneur en matières sèches a été fixée au niveau de la transition entre voie humide et voie sèche (15 à 25% MS), le taux d'inoculation sur une gamme de très basse inoculation pouvant dans certains cas conduire à l'acidification des milieux (S/X de 28 à 47), et la taille des particules sur une zone où la phase soluble du substrat est impactée par le broyage (1 cm, 1 mm et 250 µm). Enfin, outre la production d'AGV et le pH final, la production de méthane au cours de la réaction biologique a été la principale réponse analysée pour inclure la notion de dynamique.

5.1.2 MORPHOLOGICAL STRUCTURES OF WHEAT STRAW STRONGLY IMPACTS ITS ANAEROBIC DIGESTION

J-C. MOTTE, R. ESCUDIÉ, N.BEAUFILS, J-P. STEYER, N. BERNET, J-P. DELGENES, C. DUMAS*

INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

** Corresponding author: claire.dumas@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 76*

5.1.2.1 Abstract

Anaerobic Digestion (AD) of lignocellulosic residues, such as cereal straws, depends on many factors that influence substrate characteristics, particularly its biochemical composition, and thus biogas production: straw variety, growing stage, storage conditions… However, impacts of straw morphological fractions on AD have never been evaluated. For the first time, the anaerobic degradation of five different fractions of wheat straw (internodes, leaves, nodes, chaffs and rachis) was evaluated. The results indicate that these fractions present strong and significant differences in terms of ash content, organic matter, soluble phase and fibers distribution. Based on their biomethane potential, it is possible to classify these fractions into three categories: stem structures (internodes and nodes) with a methane potential of 141±14 $NmL.g_{VS}^{-1}$, ear structure (chaffs and rachis) with 186±4 $NmL.g_{VS}^{-1}$ and leaves with 242±7 $NmL.g_{VS}^{-1}$. However, similar and low biohydrogen potential was found for every fraction (around 10±2 $NmL.g_{VS}^{-1}$). These results show that selection of straws with higher contents of leaves, rachis and chaffs could significantly increase methane potential, while biohydrogen production would require pretreatment steps. The study suggests to investigate on optimization of the wheat straw variety or harvesting methods as a low cost approach to increase methane potential of agricultural residues.

5.1.2.2 KeyWords

Lignocellulosic residues; Morphological fractions; Substrate heterogeneity; Methane; Biohydrogen.

5.1.2.3 Highlights

- The biochemical composition of different parts of wheat straw was characterized
- Morphological fractions showed strong composition differences
- Leaves had the higher methane potential contrary to stem structures
- A similar and low hydrogen production was obtained for every fraction
- Straw variety or harvesting methods optimization could increase methane production

5.1.2.4 Graphical abstract

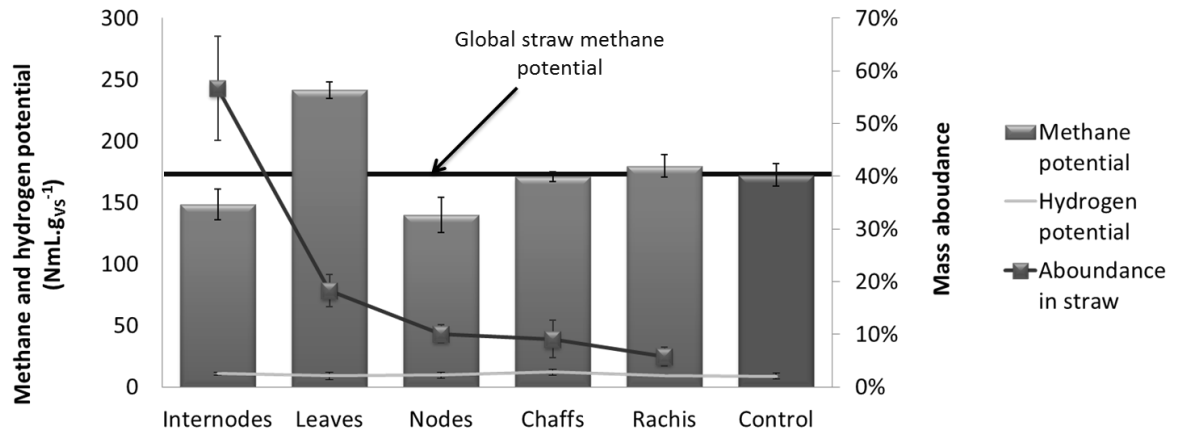


Figure 5-1 : Graphical abstract of the article untitled: “Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion”.

5.1.2.5 Introduction

The production of cereals, for food supply, is abundant and distributed worldwide. Their cultivation for grain conducts to the production of straws, residues that can represent a great opportunity for bioenergy production (Frigon & Guiot, 2010). Because of their high carbon content, these lignocellulosic residues can be used as feedstock for industry (McKean & Jacobs, 1997), energy (Demirbas, 2004), biofuels (Kaparaju *et al.*, 2009) and biogas production (Monlau *et al.*, 2013). Anaerobic digestion (AD) conducts to the production of a biogas, composed of valuable gases such as methane or hydrogen, simultaneously to a digestate that can be used as a fertilizer for crop growing, soil aeration and carbon sequestration (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). In AD, lignocellulosic biomass biodegradation is limited by the highly complex structure of the lignocellulosic matrix (Monlau *et al.*, 2013). Many studies focused on pretreating this complex organic matter to increase cellulose or hemicelluloses accessibility (Silva *et al.*, 2011), the solubilization of sugars (Sambusiti *et al.*, 2013) or lignin deconstruction (Dinis *et al.*, 2009). These pretreatments require energy and/or chemical compounds that limit the industrial scale-up. Therefore, to maximize process performances, substrate management is a fundamental parameter.

Wheat straw is often used as a model of lignocellulosic substrate for research purposes because its composition is intermediary comparing to the lignocellulosic substrates available for AD (Vassilev *et al.*, 2012). However, the average straw composition depends on many factors, such as wheat varieties (Antongiovanni & Sargentini, 1991; Agbagla-Dohnani *et al.*, 2001), growing conditions (McKendry, 2002), harvesting methods (Amon *et al.*, 2007) or maturity (Rincón *et al.*, 2010). Straw composition, in terms of morphological fractions, was rarely taken into account for the evaluation of AD potential. However, morphological

distribution can be highly variable, depending on the straw samples (variety or harvesting method) (Harper & Lynch, 1981; McKean & Jacobs, 1997; Bertrand *et al.*, 2006).

The wheat straw constitutes the residual structure of the plant after grain harvesting. Since roots are not harvested, straw is composed of stem structures (internodes and nodes), leaves and ear structures (chaffs and rachis). The literature indicates that wheat straw is mainly composed of internodes (50-60%), leaves (15-30%) and nodes (≈ 10%) (McKean & Jacobs, 1997). Furthermore, the presence of ear structure or grain residues is sometime reported but rarely measured precisely (Silva *et al.*, 2011). All these structures have different roles for the plant and therefore present strong differences in terms of biochemical composition. The variations in wheat straw composition are known to affect its biodegradation in rumen and soil (Harper & Lynch, 1981; Bhargava *et al.*, 1988; Agbagla-Dohnani *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2006) and the cellulose extraction in paper industry (McKean & Jacobs, 1997). The effect of morphological fraction of wheat straw on biogas production was never investigated. Nevertheless, a strong impact of morphological fractions of banana wastes on both biochemical characterization and methane production was observed (Kamdem *et al.*, 2013). However, banana residues are far from cereal straw in terms of morphological structure (McKean & Jacobs, 1997; Kamdem *et al.*, 2013) or composition (Vassilev *et al.*, 2012). In addition, a non-negligible impact of barley straw morphology on enzymatic hydrolysis was reported (Vandenbrink *et al.*, 2013). This research showed that the correlation between barley straw composition and hydrolysis yield strongly depends on the plant structure and histology.

The aim of this study was to evaluate the effect of wheat straw morphology on AD. The five main wheat straw morphological fractions were characterized in terms of biochemical composition, biomethane and biohydrogen productions. Then, these fractions were compared to a control fraction representative of wheat straw.

5.1.2.6 Material and methods

5.1.2.6.1 Substrate collection and preparation

The wheat straw (*Triticum Aestivum*) used in this experiment was harvested in summer 2010 in an organic farm located in southern region of France (Hérault). Straw bales were prepared and dried directly on site. Two bales of 15 kg were collected and homogenized carefully and five representative samples of about 40 g were selected for morphological characterization. Based on straw observation, five fractions were retained: internodes (In), leaves (Le), nodes (No), chaffs (Ch) and rachis (Ra). This characterization was performed by manual separation followed by mass quantification. Meanwhile, around 50 g of each morphological fraction were prepared by manual separation. After fraction collection, each fraction was milled on a cutting miller (IKA® MF 10) equipped with a 1 mm grid. This milling was chosen to homogenize samples and to avoid particle size effect on substrate characterization (Tamaki & Mazza, 2010).

To validate results from a statistical point of view, a control fraction was established and prepared manually, based on the morphological characterization of the straw. This control fraction (Co) aimed at confirming the observations by underlining the variation attributed to analytical consideration. For this purposes, the five morphological fractions and the control fraction were analyzed simultaneously. In addition, based on an assessment of morphological characterization, a theoretical estimation (Th) of the wheat straw characterization was calculated (Équation 27). For each analytical parameter, the theoretical parameter Y_{Th} can be evaluated by the sum of the contribution of each morphological fraction ($x_i \times Y_i$), where x_i is the mass percentage of the fraction in straw and Y_i the measured parameter of the fraction:

$$Y_{Th} = x_{In} \times Y_{In} + x_{Le} \times Y_{Le} + x_{No} \times Y_{No} + x_{Ch} \times Y_{Ch} + x_{Ra} \times Y_{Ra} \qquad \text{Équation 27}$$

Finally, control fraction (Co) and theoretical estimation (Th) were compared by calculating the standard score of the control fraction (Équation 28). For each replicate, the standard parameter (Y_{st}) was calculated as follows:

$$Y_{st} = \frac{y - \bar{Y}}{\Delta_Y} \qquad \text{Équation 28}$$

with y the value of the replicate parameter, $\bar{Y}$ its average and Δ_Y its standard deviation.

5.1.2.6.2 Biochemical characterization

For each fraction, all the characterizations were performed in six replicates. The Total Solid (TS), ashes and Volatile Solid (VS) contents were measured as described previously by Motte, *et al.* (2013). The distribution of lignocellulosic compounds was estimated according to a Van Soest fractionation previously described (Motte *et al.*, 2013). The protocol was modified in order to analyze the soluble phase into water extractible fraction and neutral detergent extractible fraction. These extractions were performed by successive treatments with hot water (30 min at 100°C) to solubilized water soluble compounds followed by neutral detergent solution (60 min at 100°C) for detergent soluble extraction. The Total Organic Carbon (TOC) was estimated by a carbon analyzer (TOC-V CHS/CSN, Shimadzu Corporation) consisting in a combustion of the sample at 680°C with a catalyzer (cobalt/platinum) and pure oxygen. The carbon dioxide released during the combustion is measured by a non-dispersive infrared detector. Total nitrogen was measured by the Kjeldhal method. Samples were first mineralized during 3 hours at 420°C with sulfuric acid (H_2SO_4, 96%) and a Kjeldhal catalyzer. The ammonia formed was distilled and titrated on a BUCHI 370-K. The titration was done by hydrochloric acid (0.02 N). Sugar content was measured by chromatography after an hydrolysis step (Monlau *et al.*, 2012a). 300 mg of sample were hydrolyzed with sulfuric acid (12 M) at ambient temperature during 2 h, then diluted at 1.5 M of acid and hydrolyzed during 3 h at 100°C. After cooling, samples were filtrated through fiberglass filter (GF/F, Whatman), and then on nylon filter (0.2 µm,

Acrodisc®). Filtrates were analyzed on a High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This device was a Water/Dionex system equipped with Aminex HPX-87H column (Biorad®) at 50°C. A sulfuric acid solution (0.005 M) was used as eluent at a flow rate of 0.3 mL.min^{-1}. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to estimate the crystallinity index of the cellulose. The FTIR spectra were obtained on a Nicolet iS10 FT-IR spectrometer (Thermo-scientific) equipped with a Smart iTR module (diamond plate). Spectra were recorded in six replicates, 16 scans with and an intervals resolution of 4 cm^{-1} from 4000 to 600 cm^{-1}. Then, spectra were analyzed using the Omnic software (version 9.1). Lower order index (LOI) was determined using a band ratio at 1430 and 898 cm^{-1} (peaks area). Then, the cellulose crystallinity index was estimated according to the correlation (Équation 29) of the literature (Monlau *et al.*, 2012b).

$$Crystallinity\ Index\ = LOI/(1 + LOI) \qquad \text{Équation 29}$$

5.1.2.6.3 Biomethane and biohydrogen potential

Biomethane potential of each fraction was evaluated by following the methane produced during 49 days under mesophilic conditions (35°C). The inoculum was an industrial sludge sampled in a UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) process treating sugar factory effluent. The test was performed on 550 mL flask with a working volume of 400 mL. Each flask contained a reactive medium composed of substrate sample (0.75 g_{VS}), inoculum (1.6 g_{VS}), bicarbonate buffer (1 g), 3.4 mL of a microelements solution (NH_4Cl, 26.6 g.L^{-1}; KH_2PO_4, 10 g.L^{-1}; $MgCl_2$, 6 g.·L^{-1}; $CaCl_2$, 3 g.L^{-1}), 4 mL of a trace element solution ($FeCl_2$, 2g.L^{-1}; $CoCl_2$, 0.5 g.L–1; $MnCl_2$, 0.1 g.L^{-1}; $NiCl_2$, 0.1 g.L^{-1}; $ZnCl_2$, 0.05 g.L^{-1}; H_3BO_3, 0.05 g.L^{-1};Na_2SeO_3, 0.05 g.L^{-1}; $CuCl_2$, 0.04 g.L^{-1}; Na_2MoO_4, 0.01 g.L^{-1}) and water to adjust the volume to 400 mL. The flasks were sealed and headspaces flushed with nitrogen to avoid oxygen traces. One control of the inoculum activity was done with glucose as a substrate, and two blanks (no substrate) to measure the endogenous respiration. The biogas production was quantified periodically by pressure measurements. The pressure was measured with a digital manometer LEO 2 (Keller®) with a resolution of 1 mbar. The biogas composition was measured with a micro-gas chromatograph (µGC Varian lGC-CP4900) after an injection of 3 mL of biogas sample. The µGC was equipped with an injector (100°C), two columns heated at 30 °C for the measurement of CO_2 (HayeSep A) and O_2, N_2, CH_4 and H_2S (Molsieve 5Å PLOT) and a thermal conductivity detector. Finally, the methane production was estimated by subtraction of the average endogenous respiration. Each methane potential was carried out in six replicates, for the 6 fractions (5 morphological fractions and one control) were done simultaneously with the same inoculum.

Biohydrogen potential of each fraction was evaluated by using an inoculum having an inhibited methanogenic activity. The inoculum corresponded to the soluble fraction of a solid-state anaerobic digester treating organic fraction of municipal solid waste in mesophilic conditions. The methanogenic activity was inhibited by heating the inoculum at 90°C during 20 minutes. Experiments were carried out in 550 mL flasks containing 200 mL of medium.

Each flask contained medium composed of 5 g_{VS} of substrate, 0.25 g_{VS} of inoculum, 2 g of MES buffer (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), 0.1 mL of a trace element solution ($FeCl_2,H_2O$, 1.5g.L^{-1}; H_3BO_3,H_2O, 62 mg.L^{-1}; $MnSO_4,H_2O$, 117 mg.L^{-1}; $CoCl_2,6H_2O$, 26 mg.L^{-1}; $ZnCl_2$, 120 mg.L^{-1}; $NiCl_2,6H_2O$, 28 mg.L^{-1}; $CuCl_2,2H_2O$, 38 mg.L^{-1}; $NaMoO_4,2H_2O$, 31.8 mg.L^{-1}) and water to adjust the media at 200 mL. The batch tests were then incubated in water bath at 35°C for 9 days. The biogas was followed by a multiplexed R3000 micro-gas-chromatograph (µGC). The volumetric biogas production was quantified by comparison of pressure variation every four hours. When the pressure in the reactor exceeded 1.1 bars, biogas was automatically flushed, sampled and injected (injector at 90°C) inside two analytical capillary columns heated at 80°C. The first column was dedicated to CO_2 analysis and corresponded to a MolSieve 5Å (10 m length and 0.32 mm diameter) with argon as carrier gas at a pressure of 30 psi. The second column dedicated to O_2, H_2, N_2 and CH_4 analysis was a PLOT Q (8 m length and 0.32 mm diameter) with helium as carrier gas (20 psi). Finally, gas compounds were detected by a thermal micro-catharometer (µTCD). Because the multiplexed µGC was only able to follow simultaneously 24 batches, hydrogen potential was evaluate in five replicates for the five morphological fractions and in four replicate for the control. One control of the inoculum activity was done with glucose as a substrate.

5.1.2.6.4 Statistical validation

The R software (version 2.15.1) coupled with Rcmdr package version 1.8.4 was used for statistical significances measurement, using variance analysis (ANOVA) with a p-value at 0.05. The notations of significant levels are: p-value < 0.001 "***", < 0.01 "**", < 0.05 "*" and > 0.05 "ns". Principal component analysis (PCA) was performed with XLSTAT™ Demo Version 2013.4.03 (Addinsoft, New York, NY).

5.1.2.7 Result and Discussion

5.1.2.7.1 Morphological fraction of wheat straw

Five main fractions were identified within the wheat straw sample: internodes, leaves, nodes, chaffs and rachis. Since roots are normally left in the fields and grains harvested, these two fractions were absent. Figure 5-2 presents the mass distribution of the fractions. The wheat straw was composed (on a mass basis) of internodes (57±10), leaves (18±3), nodes (10±2), chaffs (9±4) and rachis (6±2). This distribution is in agreement with the literature (Harper & Lynch, 1981; Antongiovanni & Sargentini, 1991; McKean & Jacobs, 1997): internodes constitute more than half of the straw (60 to 69%), followed by leaves (26 to 36%) and nodes (4 to 6%). The node fraction was more important comparing to previous studies. In addition, straw morphological fractionation of ear structure was rarely reported, making the comparison difficult. Silva *et al*. (2011) identified 6% of both chaffs and rachis in addition to 30% of undefined fraction containing ear structure. Differences between morphological distributions of this experiment with the literature can be justified by many factors such as variety, measurement precision or author definition of the fraction.

Therefore, the straw used in the present experience had a representative morphological composition and was more precisely characterized than the straw mentioned in the literature.

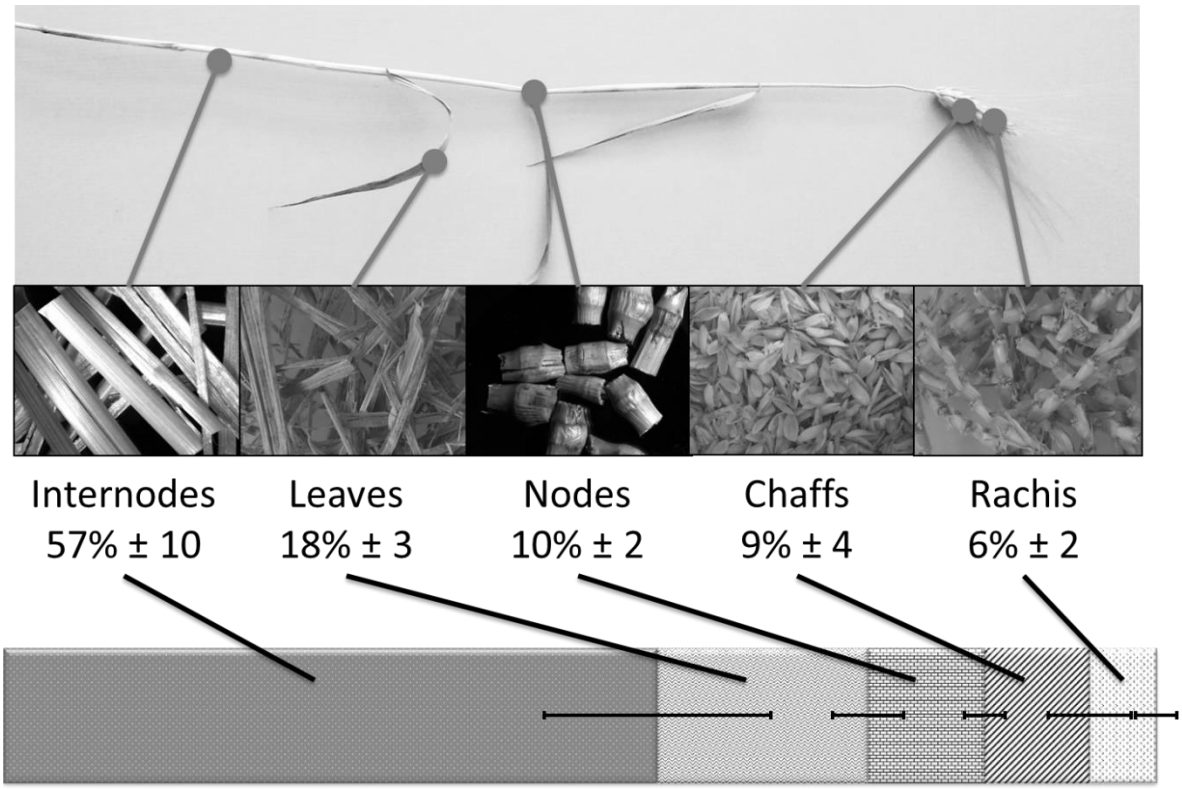


Figure 5-2: Distribution of wheat straw morphological fractions (mass percentages).

Total Solid (TS) and Volatile Solid (VS) contents of the five morphological fractions are presented in Tableau 5-1 and are globally in agreement with the literature (Han *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011). The analyses showed no significant differences between fractions based on TS content (p-value > 0.05 ns). On the other hand, the VS content (from 84.2 to 91.1%, p-value = 4.0e-5 ***) and ash content (from 5.1 to 11.6%, p-value = 4.6e-8 ***) of these five morphological fractions were discriminant. In fact, chaffs and internodes had high VS content (94.6±0.5), contrary to rachis (87.9±0.9) and leaves (89.6±0.4) which had the lowest VS content. The VS/TS ratio characterizes the abundance of organic matter in the sample. Based on this parameter, four groups (p-value = 1.0e-7 ***) were extracted, chaffs and internodes having a similar ash content of around 5.2±0.4. The higher ash content of leaves was classically reported in the literature (McKean & Jacobs, 1997; Silva *et al.*, 2011) High silica content is usually found in epidermal tissues (Han *et al.*, 2010) and therefore, high ash content in leaves could be explained by the high abundance of epidermal tissues (Akin & Burdick, 1975). Since the ash contents of the five morphological fractions differed, all the characterizations reported in this paper were expressed on a VS content basis.

	Internodes	Leaves	Nodes	Chaffs	Rachis
TS (%)[1]	96.2±0.8	95.2±0.6	94.8±0.5	95.8±0.8	95.8±0.5
VS (%)[2]	91.1±1.2	85.2±0.9	87.6±0.8	90.5±1.2	84.2±1.3
Ashes (%)[2]	5.1±0.4	9.9±0.3	7.2±0.3	5.3±0.5	11.6±0.8
VS/TS	94.7±0.5	89.6±0.4	92.4±0.4	94.5±0.6	87.9±0.9
TOC (%)[3]	46.1±0.5	44.4±0.5	45.8±0.7	41.9±0.4	46.6±0.9
TKN (%)[3]	0.1±0.0	0.6±0.1	0.2±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0
C/N	389±115	81±13	195±37	85±16	128±12

Tableau 5-1: Morphological composition of wheat straw.
(1) percentage expressed in fresh matter, (2) percentage expressed in dry matter, (3) percentage expressed on volatile solid basis.

Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TKN) contents of each morphological fraction are also presented in Tableau 5-1. Depending on the fraction, carbon content ranged from 42 to 47% (VS) and nitrogen content from 0.1 to 0.6% (VS). Therefore, morphological fractions show significant variations in terms of carbon and nitrogen contents (p-value of 3.8e-12 *** and 1.5e-13 ***, respectively). These variations are enlightened by C/N ratios that ranged from 81 for leaves to 388 for internodes with significant differences (p-value = 6.4e-11 ***). AD requires a ratio C/N of about 20-30 (Xu *et al.*, 2013) in order to favor the microorganisms growth. Consequently, wheat straw globally lacks of nitrogen for an adequate degradation in anaerobic conditions. Internodes, nodes and rachis are particularly poor in nitrogen (C/N > 100) while chaffs and leaves present more equilibrated ratios (C/N < 100). However, such high variations between fractions were never mentioned in the literature (Harper & Lynch, 1981; Silva *et al.*, 2011). This can be attributed to the high standard deviations (more than 10%) of C/N estimation, because of the low nitrogen content in straws (less than 0.5% VS) (McKendry, 2002; Demirbas, 2004).

5.1.2.7.2 Distribution of lignocellulose compounds

The distribution of lignocellulose compounds based on Van Soest compartmentation (water extractible, neutral detergent extractible, hemicelluloses, cellulose and lignin compartment) is presented in the Tableau 5-2 for the 5 fractions. Significant differences for each Van Soest compartment (p-value < 0.005) were obtained. Cellulose was the main component of straw (between 40 and 50%), followed by hemicelluloses (between 31 and 43%) and lignin (between 6 and 10%). These results confirmed that the straw is a CHL type (cellulose-hemicellulose-lignin) of lignocellulosic biomass (Vassilev *et al.*, 2012). However, the chaffs fraction was mainly composed of hemicelluloses (HCL type). This particular composition might affect its biodegradation since hemicelluloses is more degradable than cellulose under anaerobic conditions (Monlau *et al.*, 2012b).

The total soluble phase (water and neutral detergent extractible phases) represented between 9 and 19% of the wheat straw depending on the fraction (p-value = 7.0e-12 ***).

Extractible compounds of wheat straw are pectins, proteins, sugars, lipids and small parts of the cell wall (Sun, 2010). A separation of the soluble phase between water and detergent extractible compartments was performed. Water extraction solubilizes proteins, small cell wall pieces and part of sugar and pectins, while lipids and the rest of sugars and pectins are extracted by detergent (Soest, Robertson & Lewis, 1991; Sun, 2010). Since soluble compounds are easily degradable (Buffière *et al.*, 2008; Monlau *et al.*, 2012b), morphological fractions with high soluble phase are favorable for AD (kinetics and yield). Leaves (19% of soluble phase) and nodes (16% of soluble phase) contained the highest soluble phase, and this part of wheat straw seems to be favorable for AD. Nodes were composed of a strong proportion of water extractible (13%) but a low detergent extractible (3%), while chaffs were composed of similar proportion of both extractible fractions (7% detergent extractible and 5% water extractible). This result suggested variations of the soluble phase compositions depending on the fraction of wheat straw.

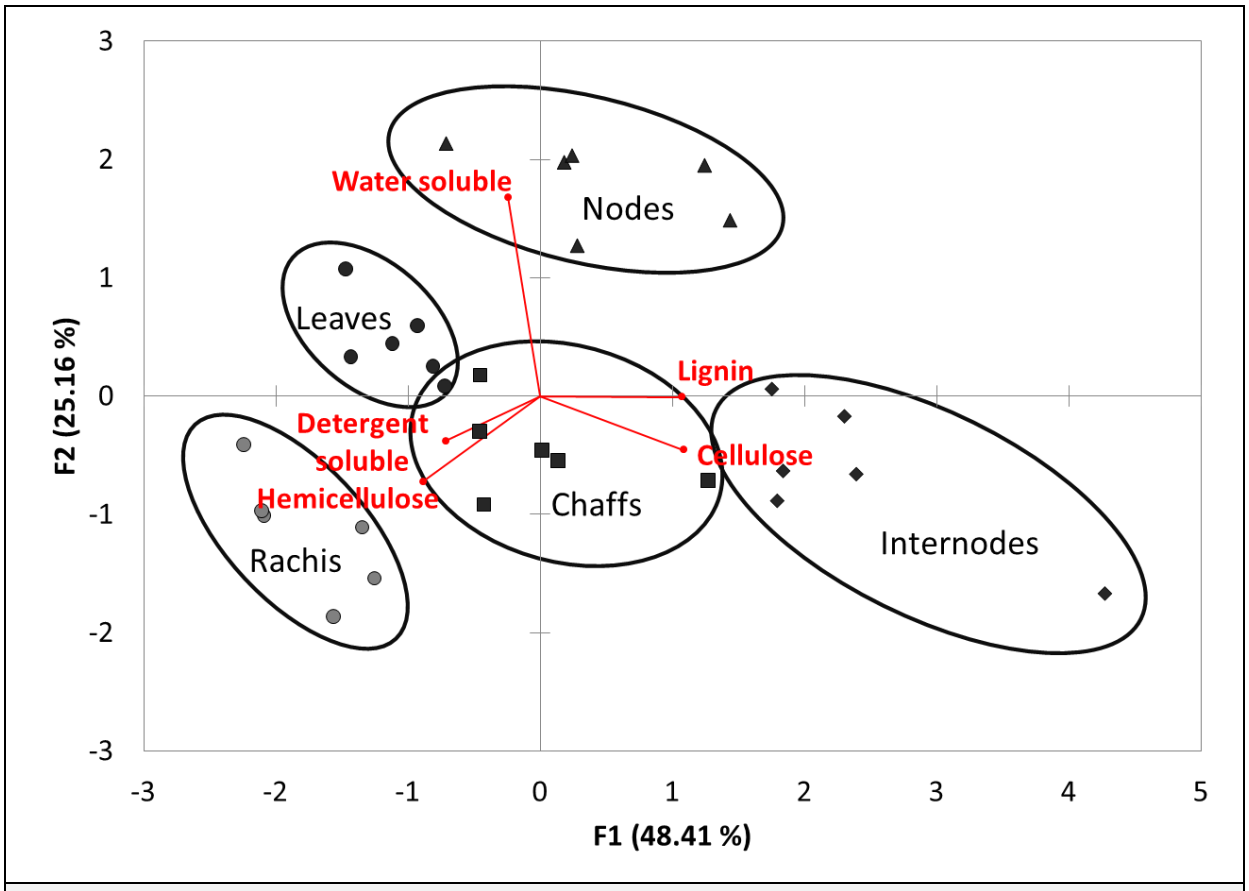


Figure 5-3: Principal component analysis of wheat straw morphological fractions based on lignocellulose distribution.

To clarify the correlation between morphological fractions and the Van Soest compartmentation, a Principal Component Analysis (PCA) was performed (Figure 5-3). Based on a representation of the two main axis (explaining 73.6% of the variance), it can be shown that the composition of five fractions was highly contrasted. Internodes were characterized by high lignin and cellulose contents, rachis by high hemicelluloses and detergent soluble compartment and nodes by high water-soluble compounds. The chaffs fraction was

characterized by an intermediary lignocellulosic distribution. Finally, the leaves fraction had high water and detergent extractible contents (10 and 9%), but relatively poor lignin and cellulose contents (6 and 41%, respectively). Therefore, internodes and leaves presented an opposite lignocellulosic composition, while they constituted the main masses of straw.

	Internodes	Leaves	Nodes	Chaffs	Rachis	p-value
Water extractibles (%)	5±3	10±1	13±1	5±2	7±1	4.6e-10 ***
Detergent extractibles (%)	4±1	9±1	3±1	7±1	3±1	1.8e-10 ***
Hemicelluloses (%)	31±1	34±1	34±1	43±1	39±1	7.5e-12 ***
Cellulose (%)	50±1	41±1	42±2	40±2	44±2	2.3e-15 ***
Lignin (%)	10±3	6±1	8±2	6±1	7±2	4.0e-3 **
Glucose (%)	32±0	25±1	26±2	29±0	28±1	2.8e-14 ***
Xylose (%)	17±0	17±1	17±0	18±1	21±1	3.1e-11 ***
Arabinose (%)	1±0	2±0	3±0	3±0	2±0	< 2e-16 ***
Arabinose/ Xylose	7±0	13±0	17±0	14±0	9±0	< 2e-16 ***
Crystallinity index (% of cellulose)	49±1	51±1	52±4	45±2	47±2	5.3e-4 ***

Tableau 5-2: Lignocellulosic fractionation based on Van Soest analysis.
Data are expressed on volatile solid basis.

Distribution of sugars is presented in Tableau 5-2. Glucose is a component of cellulose, while xylose and arabinose are components of hemicelluloses. The arabinose/xylose ratio gives information about the substitution degree of the biomass. The substitution degree for all the fractions ranged from 7 to 17%, which is consistent with the literature (Tamaki & Mazza, 2010; Silva *et al.*, 2011). The substitution of hemicelluloses is an indicator of its accessibility to microorganisms (Bertrand *et al.*, 2006), and low level of substitution favors AD degradation (Chesson *et al.*, 1983). The arabinoxylanes of nodes were highly substituted (17%) suggesting that hemicelluloses of nodes were poorly degradable. On the opposite, hemicelluloses of internodes and rachis seemed to be more degradable, since their substitution degrees were low (7 and 9% respectively). In addition, the degradability of cellulose is correlated to its crystallinity. The crystalline cellulose proportion for the 5 morphological fractions was estimated with the lateral order index (LOI) as proposed in the literature (Monlau *et al.*, 2012b) and it ranged from 45 to 52% (p-value = 5.3e-4 ***). This analysis suggests that around 52% of the cellulose of nodes was crystalline and therefore non-degradable by AD processes (Monlau *et al.*, 2012b), while chaffs (only 45% of crystalline cellulose) presented more amorphous cellulose content that could be favorable for AD.

5.1.2.7.3 Biomethane and biohydrogen potentials

The cumulative methane production of the five morphological fractions is presented in Figure 5-4. Bioreactions were followed during 50 days. Depending on the morphological fractions, the methane production differed drastically from 140 and 245 $NmL.g_{VS}^{-1}$. Both methane potential and time to achieve the reaction are consistent with the literature. A methane potential of about 140 and 250 $NmL.g_{VS}^{-1}$ is usually obtained after about 30 days (Sharma *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2012; Sambusiti *et al.*, 2013). An ANOVA analysis based on the methane production (Tableau 5-3) enables the separation into three groups (p-value = 6.6e-15 ***): leaves fraction with the highest methane potential of 242±7 $NmL.g_{VS}^{-1}$, chaffs and rachis with methane potential 186±4 and 168±9 $NmL.g_{VS}^{-1}$, respectively, and nodes and internodes with a lower production of 141±14 and 149±12 $NmL.g_{VS}^{-1}$, respectively. These three groups correspond to leaves, stems (nodes and internodes) and ears (rachis and chaffs). Therefore, the use of straw composed of less quantity of stem seems favorable to methane production.

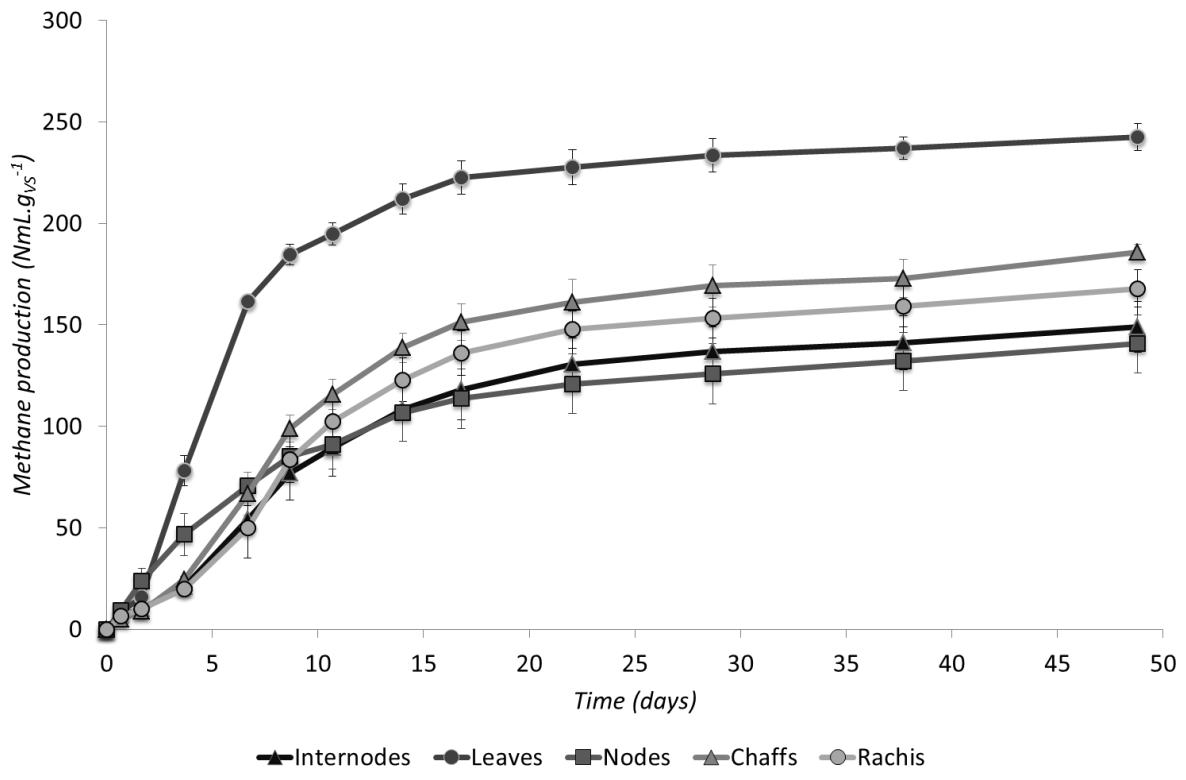


Figure 5-4: Cumulative methane production of the 5 morphological fractions reported in Volatile Solid.

Leaves and nodes were the fractions having the faster initial methane production (Figure 5-4). These fractions were composed of high soluble phase content (19 and 16%, respectively). The importance of soluble phase in AD start-up was previously enlightened in the literature (Kamdem *et al.*, 2013), and therefore, the soluble phase of leaves and nodes favored the establishment of the reaction. After the soluble phase consumption, the structure of the solid phase (lignocellulose distribution) affected the degradation. Hydrolysis

of solid matter is known to be the limiting step of AD (Vavilin, Rytov & Lokshina, 1996). Thus, the low degradation of nodes can be attributed to the poor digestibility of hemicelluloses (high substitution degree) and high lignin content, since these two characteristics differed for leaves and nodes (respectively at 13 and 17% for substitution degree, and 6 and 8% for lignin content) (Vandenbrink *et al.*, 2013). The strong influence of lignin in the degradation process was also enlightened by low methane potential of internodes and rachis (high lignin content).

	Internodes	Leaves	Nodes	Chaffs	Rachis	p-value
CH_4 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	148±12	242±7	140±14	171±4	180±9	6.6e-15 ***
H_2 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	10.9±1.2	9.0±2.7	9.6±2.3	12.0±2.5	9.5±0.9	> 0.05 ns

Tableau 5-3: Biogas potential of the 5 morphological fractions.
Data are expressed on volatile solid basis.

The biohydrogen potential (BHP) of the five morphological fractions was evaluated during 9 days (Tableau 5-3). Based on biohydrogen potential, no significant variations between fractions (p-value > 0.05 ns) were observed with an average potential of 10.0±2.2 $NmL.g_{VS}^{-1}$. Furthermore, the time to reach the maximal hydrogen production was around 4 days for all the fractions. This production yield and duration were consistent with the value found in the literature (Quéméneur *et al.*, 2012a). Soluble phase is known to strongly affect the biohydrogen potential of lignocellulosic substrates (Monlau *et al.*, 2012b). Therefore, the high similarity of biohydrogen potential for the 5 fractions was unexpected since strong differences on soluble phase were observed. BHP test showed however strong standard deviation between replicates directly associated to low biohydrogen yield of untreated straws. However, these results confirm that biohydrogen production from wheat straw requires a pretreatment step in order to solubilize the lignocellulosic matter (Monlau *et al.*, 2013).

5.1.2.7.4 Impact of morphology on the energetic potential of wheat straw

Tableau 5-4 presents the theoretical (Th) estimation of the analytical parameters and the control fraction characteristics. Both control and theoretical calculations confirm that the wheat straw used in this experiment presented a composition in the same order of magnitude than straws characterized in the literature (Harper & Lynch, 1981; Sun, 2010; Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012). This average composition conducted to similar biomethane and biohydrogen potential comparing to the literature : around 170 $NmL.g_{VS}^{-1}$ of methane (Sharma *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2012; Sambusiti *et al.*, 2013) and around 10 $NmL.g_{VS}^{-1}$ of biohydrogen (Quéméneur *et al.*, 2012a).

	Theoretical (Th)	Control (Co)
TS (%)[1]	95.8%	96.0±0.8
VS (%)[2]	89.0%	89.2±1.1
Ashes (%)[2]	6.8%	6.8±0.3
VS/TS	92.9%	92.9±0.3
Water extractible (%)	6.8%	7.4±2.2
Detergent extractible (%)	5.1%	5.4±1.0
Hemicelluloses (%)	33.6%	33.8±1.2
Cellulose (%)	46.2%	46.0±2.4
Lignin (%)	8.2%	7.4±0.7
Crystallinity (%)[3]	50%	49±1
Glucose (%)	29.8%	30.3±1.6
Xylose (%)	17.2%	17.3±1.3
Arabinose (%)	1.7%	1.7±0.1
Arabinose/Xylose	9.8%	10.1±0.3
TKN (%)	0.3%	0.3±0.0
TOC (%)	45.5%	45.5±1.1
C/N	273	164±27
CH_4 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	169	172±9
H_2 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	10.4	8.8±2.5

Tableau 5-4: Control characterization and difference with predicted values.
All percentages are expressed on volatile solid basis except: (1) percentage expressed in fresh matter, (2) percentage expressed in dry matter and (3) percentage of cellulose.

To compare control characterization with expected value based on morphological analysis, the control replicates (Co) were standardized (according to Équation 28) and represented on Figure 5-5, and the theoretical values (Th) were added as bullets. This representation describes the additive effect of morphology characterization by comparing the contribution of each morphological fraction to the straw characterization. Therefore, straw composition is affected by morphology when the theoretical estimation ranged in the confidence interval of the control fraction (Figure 5-5). For the majority of parameters, the results show that calculated values are in the intervals defined by the control, the only exception being the C/N ratio. This ratio was strongly dependent on nitrogen content, which was too low for precise measurements. Indeed, because the nitrogen content in internodes seemed underestimated and this fraction represented 57% of the straw, the theoretical C/N ratio was overestimated comparing to the control. Finally, except for this parameter (C/N), a strong impact of the morphology on wheat straw composition was proved. This confirms that the wheat straw composition is directly associated to the contribution of each fraction.

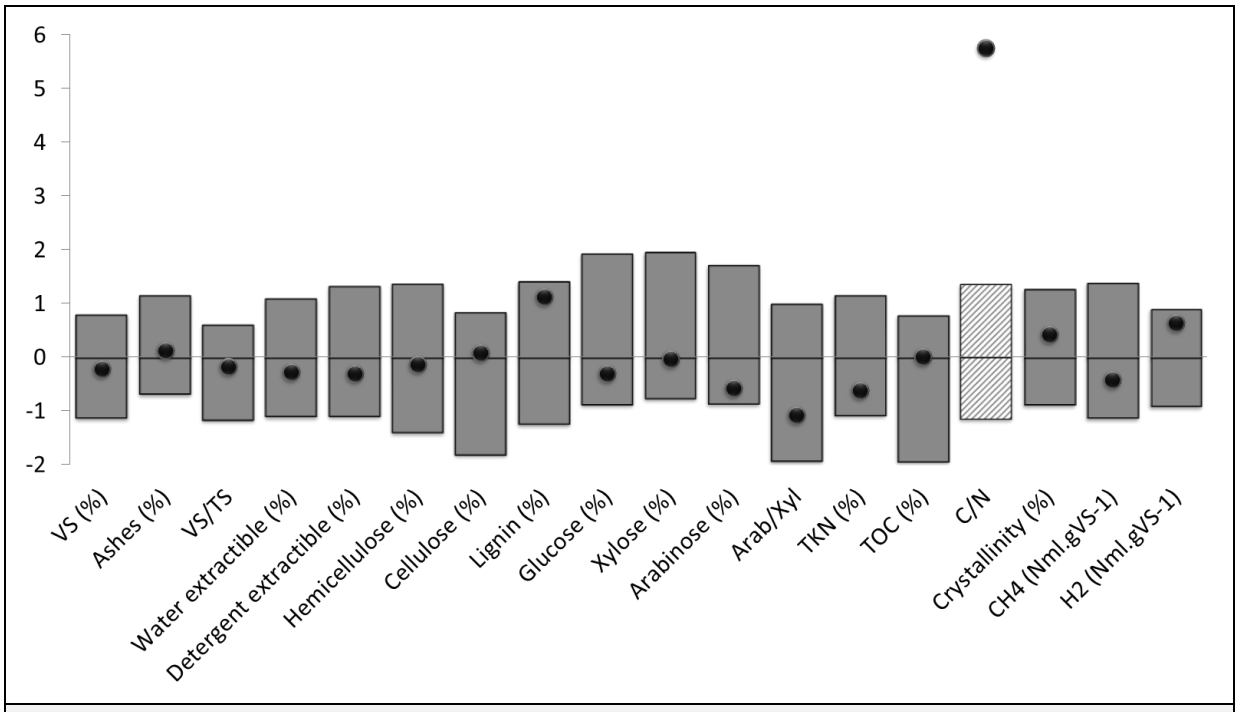


Figure 5-5: Representation of the 21 standardized variables of the control fraction (Co). The theoretical composition is represented as bullets.

Figure 5-6 compares the abundance of straw morphological fractions and their contribution on the methane potential (expressed in TS content). Internode fraction, which is the main fraction of wheat straw (around 57%), only accounts for 51% of the methane production. Node fraction occurs for 8% of the methane production whereas it represents around 10% of the straw. Such differences are related to the low methane potential of these two fractions characterized by high lignin content that limits their hydrolysis (Monlau *et al.*, 2013). On the other hand, the leaves fraction explains 25% of the BMP while representing only 18% of the straw. This difference was attributed to the high BMP of leaves related to their higher composition in soluble compounds (Monlau *et al.*, 2012b). Therefore, higher leaves content in straw could easily conduct to a significant increase of straw methane potential. Interestingly, chaffs and rachis fractions, representing a small abundance in the straw (9 and 6% respectively), contribute to 9 and 6% of the BMP, respectively. These observations could be explained by the high proximity between the BMP of rachis and chaffs and the average BMP of the straw. However, since their BMP is higher than the one of stems (internodes and nodes), straw enriched with ear (chaffs and rachis) could increase the overall BMP of the straw, and thus the interest to use this lignocellulosic residue in AD processes. Finally, to maximize the methane production from wheat straw, the relative abundance of leaves and ear organs should be increased by proper substrate selection and harvesting.

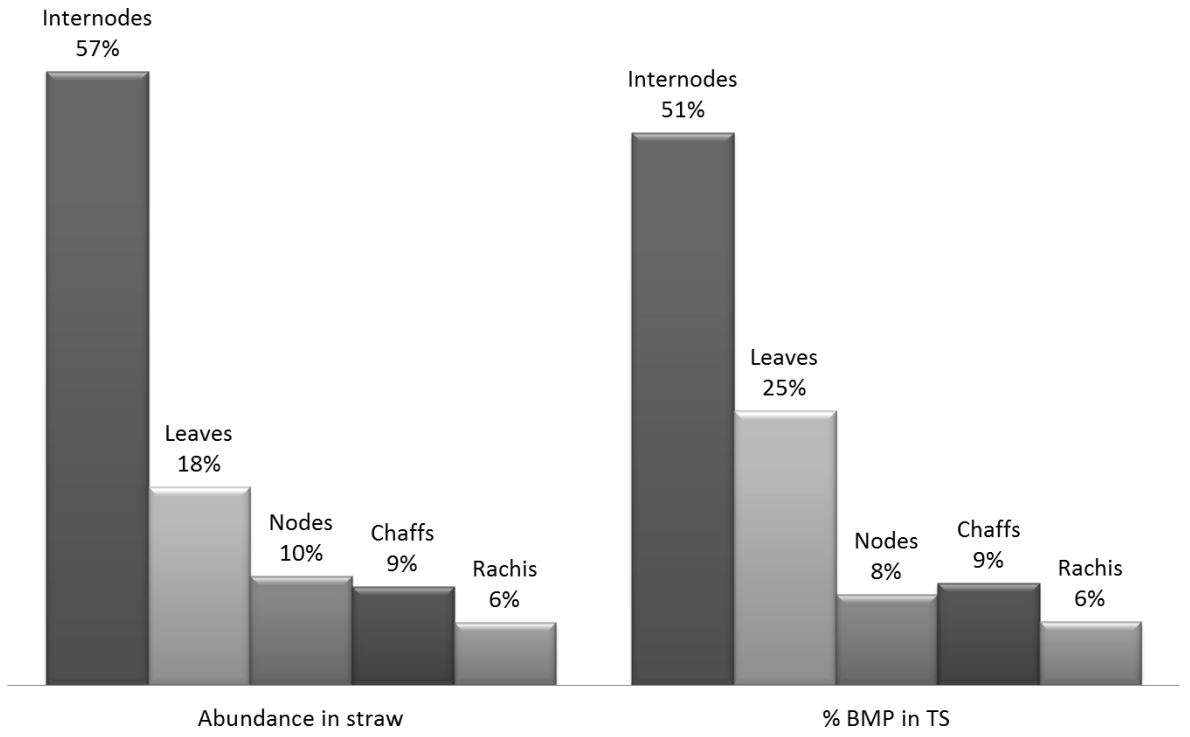


Figure 5-6 : Comparison between proportion of morphological fraction in wheat straw and their individual contribution to the methane production (BMP) expressed in dry matter (TS).

5.1.2.8 Conclusions

The present study demonstrated that straw morphology has a strong impact on its potential to produce biomethane. Leaves fraction presented the higher methane potential associated to low lignin content and a high soluble phase despite a high substitution degree and high crystallinity of the cellulose. Meanwhile stems structure, such as internodes and nodes, had similar lower BMP despite strong differences in biochemical composition. Therefore, the preferential selection of straw variety with high leaves content should be favored for anaerobic digestion purpose. Furthermore, ear structures such as chaffs and rachis, which are highly dependent on harvesting methods, presented a higher BMP than the stems structures. Harvesting techniques could be optimized for a better collection of rachis and chaffs, since their BMP is higher than the stems. If anaerobic digestion of straw is anticipated, selection of leaves enriched variety and proper harvesting methods should be studied to increase significantly the methane production.

5.1.3 DYNAMIC EFFECT OF TOTAL SOLID CONTENT, LOW SUBSTRATE/INOCULUM RATIO AND PARTICLE SIZE ON SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION

J-C. MOTTE, R. ESCUDIÉ, N. BERNET, J-P. DELGENES, J-P. STEYER, C. DUMAS*

INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

** Corresponding author: claire.dumas@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 76*

5.1.3.1 Abstract

Among all the process parameters of solid-state anaerobic digestion (SS-AD), total solid content (TS), inoculation (S/X ratio) and size of the organic solid particles can be optimized to improve methane yield and process stability. To evaluate the effects of each parameter and their interactions on methane production, a three level Box-Behnken experimental design was implemented in SS-AD batch tests degrading wheat straw by adjusting: TS content from 15 to 25%, S/X ratio (in volatile solids) between 28 and 47 and particle size with a mean diameter ranging from 0.1 to 1.4 mm. A dynamic analysis of the methane production indicates that the S/X ratio has only an effect during the start-up phase of the SS-AD. During the growing phase, TS content becomes the main parameter governing the methane production and its strong interaction with the particle size suggests the important role of water compartmentation on SS-AD.

5.1.3.2 KeyWords

Dry anaerobic digestion; Total solid content; Particle size; Substrate/inoculum ratio; Lignocellulosic residue.

5.1.3.3 Highlights

- Total solid content is the main factor that drives solid-state anaerobic digestion.
- S/X ratio has an impact on the start-up phase of dry anaerobic digestion.
- The start-up phase is affected by the soluble fraction of fine particle.
- Both TS content and particle size modify the apparent water quantity.

5.1.3.4 Graphical abstract

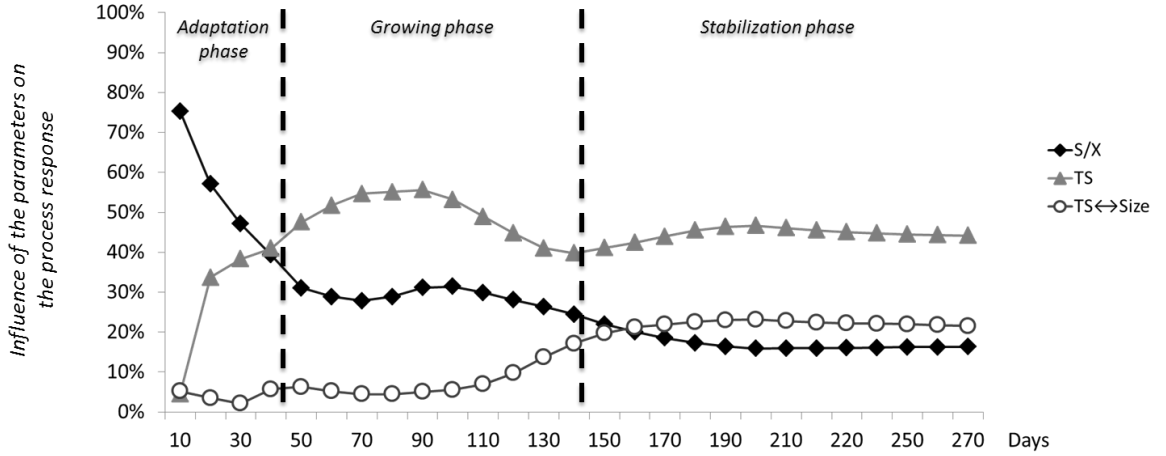


Figure 5-7 : Graphical abstract of the article untitled: "Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion".

5.1.3.5 Introduction

Anaerobic digestion (AD) of solid wastes, such as agricultural residues or organic fraction of municipal solid waste, is a process in constant development at industrial scale because of its capacity to degrade organic matter simultaneously into a valuable biogas composed of methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) and into a nutrient-rich digestate with agronomic qualities (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Total solid (TS) content of the medium within the anaerobic digester is used to define two technologies: wet AD for TS below 15% and Solid-State AD (SS-AD) for TS content higher than 15% (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; De Baere & Mattheeuws, 2010). Operating in dry conditions allows the increase of the substrate concentration, which leads to the reduction of the digester volume for a given organic loading rate, the reduction of specific energy consumption for heating the digester and the simplification of the final step for the digestate dewatering (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). These advantages resulted in an early development of the SS-AD systems at the industrial scale.

Because of a lack of scientific knowledge, SS-AD processes are not optimized and performances could therefore be improved. The methane yield and stability of industrial digesters are usually dependent of the empirical knowledge of the operators. Dry anaerobic digesters are mainly handled in batch mode or continuous plug-flow mode depending on the origin and quantity of the substrate. Several process parameters can be optimized to operate SS-AD: TS content, S/X ratio, physico-chemical pretreatment of the substrate, mixing mode, temperature… (Karthikeyan & Visvanathan, 2012).

A main parameter that drives SS-AD is the water content (*i.e.*, TS content) (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). SS-AD industrial plants are operated from 20 to 30% TS and up to 40% TS for some technologies (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). It is mostly admitted that

increasing TS content leads to lower process performances in terms of methane production and substrate conversion (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Some authors observed that TS content affects the various steps of the AD process: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis (Fernández *et al.*, 2001; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b; Le Hyaric *et al.*, 2012). However, if the dynamics of dry anaerobic ecosystems depends on TS content, only one dynamic study has yet been published (Shi *et al.*, 2013).

Inoculation phase is an important step affecting SS-AD, both in batch and continuous mode (digestate recycling). Inoculation is usually characterized by the substrate (S) to inoculum (X) ratio (S/X), for example on a volatile solid (VS) basis ($g_{VS\text{-}S}.g_{VS\text{-}X}^{-1}$). At the industrial scale, SS-AD generally involves very low S/X ratios in order to maximize reaction kinetics and to avoid the risks of AD failure (S/X ≈ 0.3-0.5 in VS basis) (Guendouz *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013). At the laboratory scale, S/X ratios between 2 and 6 (in VS basis) are typically used, suggesting that S/X ratio actually applied in industry can be optimized (Brown *et al.*, 2012; Liew *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). By considering only the first 30 days of operation, some authors demonstrated an inefficiency of AD digestion for S/X higher than 4 (Cui *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2012). However, experiments operated under higher S/X ratio were successfully realized (10 in VS basis) (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012) but required an adaptation phase longer than 30 days and a duration of experiment higher than 250 days in order to achieve the AD reaction. The main advantage of operating under high S/X ratio is the observation of changes in the microbial communities, which are not detectable at low S/X ratios. Therefore, for an academic purpose, the main advantage of a low inoculation is the simplification of the microbial diversity of the dry anaerobic media. Moreover, this approach allows the study of the dry anaerobic process by an important deceleration of the process dynamics.

The reduction of the particle size represents an interesting pretreatment of solids for biological transformations since it is not necessary to add water or chemical substances, and the relative technical simplicity (Barakat *et al.*, 2013). It allows higher biological processes kinetics through a release of dissolved organic matter (Müller, 2003), as well as an increase of solid particles surface area and pore volume, and a modification of the lignocellulosic structure such as the crystallinity of the cellulose or lignin distribution (Monlau *et al.*, 2013). Several authors investigated the effect of particle size on the anaerobic digestion process, but only in wet AD. Comminution generally increases biogas yield and degradation kinetics (Sharma *et al.*, 1988; Mshandete *et al.*, 2006; Lindmark *et al.*, 2012). However, contradictory results have been obtained probably because of the release of inhibitory compounds (Izumi *et al.*, 2010) or the low effect of the pretreatment on the available surface area (Pommier *et al.*, 2010). If an economical optimum of particle size reduction is around 1 mm (Barakat *et al.*, 2013), a biological optimum for AD may also exist as suggested by Izumi *et al.* (2010) (0.6 mm for food waste) or Dumas *et al.* (2010) (0.2-0.3 mm for wheat straw).

The influence of operating parameters on AD is often studied separately and contradictory results found in the literature may be attributed to the interdependency (interaction) of these parameters. To our knowledge, the simultaneous effect of TS content, S/X ratio and particle size has not yet been investigated. However, due to the high sensitivity of dry media, their interaction may be critical for keeping adequate AD performances, as a strong interaction between TS content and S/X ratio (Forster-Carneiro *et al.*, 2007, 2008). According to the literature, three selected factors have been investigated within the range of critical zone effects. The TS content was studied between 15 and 25% TS to investigate the limit between wet and dry AD (Forster-Carneiro *et al.*, 2007). A S/X ratio between 47 and 28 (on a VS basis) was selected to identify the dynamic of the SS-AD (Lü *et al.*, 2012). The size of particles was reduced from 0.1 to 1.4 mm (Dumas *et al.*, 2010; Izumi *et al.*, 2010). A Box-Behnken experimental design (Wang & Wan, 2009) has been applied in the purpose of analyzing the TS content, S/X ratio and particle size effects and their interaction on the SS-AD dynamics of lignocellulosic residues.

5.1.3.6 Material and methods

5.1.3.6.1 Substrate

Wheat straw (*Triticum aestivum*) was used as a model of the lignocellulosic substrate available for dry anaerobic digestion. The substrate used in this experiment was harvested in summer 2010 in an organic farm located in southern France (Hérault). Straw bales were homogenized and stored at ambient temperature. Three size fractions, coarse, medium and fine, were prepared by using a cutting miller. Average particle sizes were obtained by a gravimetric technique (coarse and medium fraction) or a laser granulometer (fine fraction) depending on the technical limitations. The coarse fraction was prepared by milling straw with a 10 mm grid and then sieving between grids of 4 and 10 mm (average particle size of 1.45 mm). The medium fraction was obtained by milling with a 1 mm grid, and sieving between grids of 1 and 4 mm (average particle size of 0.67 mm). The fine fraction was milled with a grid of 0.25 mm (average particle size of 0.11 mm).

5.1.3.6.2 Experimental device in dry conditions

The inoculum was sampled from a mesophilic SS-AD pilot treating organic fractions of municipal solid waste. A liquid phase was extracted by centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C) and used to inoculate the batch tests. SS-AD batch tests were obtained by incorporating 100 g of medium into a 500 mL sealed flask. The composition of the medium was calculated to sustain the experiment conditions. First, about 15, 20 and 25 g of straw were added for TS content of 15, 20 and 25% respectively, while taking into account the slight variations of TS content of the three particle sizes (0.11, 0.67 or 1.45 mm). Then, the quantity of inoculum was adjusted to respect the S/X ratio (28, 37.5 or 47 in VS). Finally, water was added, to sustain the final TS content. To maintain a constant C/N ratio of about 40, NH_4Cl was added, its quantity depending on the S/X ratio. In each flask, 5.2 g of bicarbonate buffer (H_2CO_3),

corresponding to an initial pH of 8.4, were added as well as 1 mL of a trace element solution having the following composition: $FeCl_2,4H_2O$ (20 mg.L^{-1}), $CoCl_2,6H_2O$ (5 mg.L^{-1}), $MnCl_2,4H_2O$(1 mg.L^{-1}), $NiCl_2,6H_2O$ (1 mg.L^{-1}), $ZnCl_2$ (0.5 mg.L^{-1}), H_3BO_3 (0.5 mg.L^{-1}), Na_2SeO_3 (0.5 mg.L^{-1}), $CuCl_2,2H_2O$ (0.4 mg.L^{-1}), $Na_2MoO_4,2H_20$ (0.1 mg.L^{-1}). Once the reactors were sealed, nitrogen gas was flushed into the headspace to avoid traces of oxygen. Batch tests were incubated at 35$_{\pm}$1°C during 273 days. Because biological tests are known to be very sensitive to low inoculation ratios (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), three replicates were carried out for each condition. In order to check the methanogenic activity of the inoculum, a control batch reactor was realized with ethanol as a substrate. Even if endogenous production could be neglected in high S/X ratio conditions, two blanks were carried out to correct the endogenous contribution implied by the level of S/X ratio.

5.1.3.6.3 Biogas quantification and analysis

Biogas production was quantified periodically by pressure measurements. A digital Manometer LEO 2 (Keller®) associated with a needle provides a measurement with a resolution of 1 mbar. The biogas composition was measured with a micro-gas chromatograph (Varian lGC-CP4900). An injector at 100°C allows the injection of 3 mL of biogas sample to pass through two columns heated at 30 °C: a HayeSep A column for CO_2 separation and a Molsieve 5Å PLOT column for O_2, N_2, CH_4 and H_2S separation. The detection is ensured by a thermal conductivity detector. After subtracting the endogenous respiration, both pressure measurement and biogas analysis allow for a correct estimation of the production of biogas (CO_2 and CH_4) expressed in NmL.g_{VS}^{-1}, in order to compare the conditions of the experimental conditions.

5.1.3.6.4 Analytical methods

At the end of the experiment, TS content was measured by drying samples at 105°C during 48 hours and VS content was estimated by an incineration at 550°C during 3 hours. Liquid fractions were prepared using a precise gravimetric dilution at around 5% TS. The soluble phase was obtained by filtrating with a glass filter at 2.7 µm (GF/D Whatman). The pH was measured immediately after dilution. VFA were measured with a gas chromatograph Perkin Clarus 580 with an Elite-FFAP crossbond®carbowax® 15 m column connected to an FID detector at 280°C and nitrogen at 6 mL.min^{-1} as carrier gas. A Van Soest fractionation was carried out on the three particle sizes using a fibrebag system (Gerhardt).

5.1.3.6.5 Experimental design

The three factors (S/X ratio, TS content and average particle size) have been studied using a three level Box-Behnken plan. This experimental design was chosen because of its ability to maintain constant prediction error for every point of the study area (criteria of isovariance by rotation) (Wang & Wan, 2009). This plan was implemented with the objective of screening the effect of each factor. Therefore, the design was centered on its critical zone for the three factors as suggested in the literature. The 13 conditions of the experimental

design were carried out in triplicate. Tableau 5-5 presents the factors of the experimental design in terms of code value and real units. -1, 0 and +1 levels correspond respectively to 28, 37.5 and 47 $g_{VS\text{-}S}.g_{VS\text{-}X}^{-1}$ for S/X ratio, 15, 20 and 25% TS for TS content and 0.1, 0.7 and 1.4 mm for average particle size of solid substrate. The response of the AD system to the experimental design was analyzed by quantifying dynamically the methane production and by measuring the final concentration of VFA and pH. The response on each individual replicate has been integrated thanks to a quadratic model implemented on MATLAB® (Version 7.11.0.584 R2010b):

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^{k} a_i x_i + \sum_{i=1}^{k} a_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j}^{k} a_{ij} x_i x_j \qquad \text{Équation 30}$$

This model is composed of several coefficients a associated to each factor x_i (TS, S/X and particle size). It allows for a description of the effects of the factors on three responses y: CH_4 production, pH and VFA concentration. Because three factors and three levels were used, nine coefficients and one constant were estimated through a regression process. Three linear coefficients a_i describe the global effect of each individual factor x_i. Both the value and the sign of the coefficients give information about the effect of the associated factors on the response y. To cover the limits of the study area, three quadratic coefficients a_{ii} were used. They describe the effect of each factor x_i on their maximal values expressed in that case as x_i^2. Low a_{ii} indicates that the study area is correctly centered and that each factor x_i is correctly described by a_i coefficient. Three coefficients a_{ij} indicate the level of interaction between factors x_i and x_j, and represent the variation of a factor x_i in function of the second factor x_j level (Wang & Wan, 2009). The analysis of the coefficient is based on calculated value or on abundance (percentage of the sum of the coefficient) in order to study the dominance of some factors on the response. The coefficient a_0 is the value predicted by the model in the center of the study area. The coefficient a_0 is required to adjust the model, and it is not taken into account for the calculation of the normalized coefficients. Finally, the regression calculation provides statistical indicators, which indicate the quality of the model: the Fisher's F-test with a 95% confidence level (p-value < 0.05 require for correct significance) and the coefficient of determination R^2 (> 0.75 for the aptness of the model).

Observation number	Normalized level			Actual value		
	S/X	TS content	Particle size	S/X (% VS)	TS content (% TS)	Particle size (mm)
1	0	-1	-1	37.5	15%	0.1
2	1	0	-1	47	20%	0.1
3	0	1	-1	37.5	25%	0.1
4	-1	0	-1	28	20%	0.1
5	-1	-1	0	28	15%	0.7
6	1	-1	0	47	15%	0.7
7	1	1	0	47	25%	0.7
8	-1	1	0	28	25%	0.7
9	0	-1	1	37.5	15%	1.4
10	1	0	1	47	20%	1.4
11	0	1	1	37.5	25%	1.4
12	-1	0	1	28	20%	1.4
13	0	0	0	37.5	20%	0.7

Tableau 5-5: 3^3 Box-Behnken experimental design: observation number, normalized level of independent factors, and correspondence with actual values of factors.

5.1.3.7 Results and Discussion

5.1.3.7.1 Initial substrate characterization

Tableau 5-6 shows the characterization of the substrate milled at three particle sizes. A slight increase of TS content was observed when decreasing the particle size. This change was attributed to the heating induced during the comminution (Barakat *et al.*, 2012). Since VS contents of the substrate milled at three particle sizes were similar, each fraction was comparable and the decrease in TS content was corrected by a water addition for the batch preparation. The Van Soest fractionation indicated a similar lignocellulosic structure (same proportion of cellulose, hemicelluloses, lignin and ash) except for the fine fraction where a higher fraction of soluble phase was identified. An increase of soluble compounds is generally observed after a strong mechanical pretreatment (Mshandete *et al.*, 2006; Izumi *et al.*, 2010).

	Fine	Medium	Coarse
TS (% TS of raw susbtrate)	94.5±0.5%	93.5±0.5%	92.9±0.5%
VS (% TS)	92.0±0.5%	93.5±0.5%	91.6±0.5%
Soluble fraction (% TS)	18.3±1.3%	9.5±0.6%	6.8±0.8%
Hemicelluloses (% TS)	30.0±0.3%	33.2±1.1%	36.0±3.4%
Cellulose (% TS)	38.5±0.4%	44.0±1.3%	44.1±2.2%
Lignin (% TS)	6.7±1.4%	6.5±0.8%	6.9±0.5%
Ash (% TS)	6.4±1.3%	6.9±0.8%	6.1±0.5%

Tableau 5-6: Van Soest fractionation, TS and VS content of wheat straw milled at three particle sizes.

5.1.3.7.2 Characterization and analysis of the final process response

5.1.3.7.2.1 Anaerobic digestion performances

Tableau 5-7 presents the total methane production, pH and VFA concentration after 273 days of experiment for all the conditions. It provides information about the final equilibrium of the system and the global methane production. Methane production ranged from 17 to 115 NmL.g_{VS}^{-1}, defining favorable conditions (70 to 115 NmL.g_{VS}^{-1}) and two particularly unfavorable conditions (<20 NmL.g_{VS}^{-1}) for observations 3 and 7. The favorable conditions presented a large distribution of methane production, indicating a strong influence of the process parameters. Two conditions (observations 2 and 8) showed a high standard deviation and a low average methane production (≈ 70 NmL.g_{VS}^{-1}), which can be attributed to a critical location of these points in the experimental design. To provide scientific knowledge about dry system behaviors, this study used a high S/X ratio in order to decelerate the reaction and split the different reaction stage. Therefore, there is no data of processes operated at such low S/X ratio. However, Cui, *et al.* (2011) obtained a slightly higher cumulative methane production with a similar substrate in dry conditions (around 150 NmL.g_{TS}^{-1} of methane against 115 NmL.g_{TS}^{-1} in the present study). The difference can be attributed to lower substrate accessibility in the present study, probably because of the lower inoculation and the use of a non-optimized reactor. pH values were similar around 8.5 and close to the initial pH for all the conditions, except for the two unfavorable conditions (pH < 7.5). This decrease in pH is consistent with a higher VFA concentration. Unfavorable conditions revealed an inhibition of the AD by VFA accumulation (mainly composed of acetic, propionic and butyric acids). It is important to notice that the favorable conditions never showed residual concentration of acetic and butyric acid, but an accumulation of propionic acid was identified in some batch tests. The resilience of propionic acid may be attributed to its lower rate of degradation by syntrophic bacteria (Vavilin & Lokshina, 1996).

Observation number	CH_4 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	pH	VFA ($mmol.g_{VS}^{-1}$)	Acetic acid ($mmol.g_{VS}^{-1}$)	Propionic acid ($mmol.g_{VS}^{-1}$)	Butyric acid ($mmol.g_{VS}^{-1}$)
1	111.2±2.0	8.4±0.1	2.0±0.2	0.0±0.0	1.5±0.2	0.0±0.0
2	70.2±37.9	8.4±0.2	2.1±0.8	0.7±1.0	1.0±0.2	0.1±0.2
3	17.1±0.7	6.8±0.3	3.3±0.3	2.1±0.0	0.7±0.2	0.4±0.1
4	108.8±6.7	8.5±0.0	1.1±0.1	0.1±0.0	1.0±0.1	0.0±0.0
5	109.9±9.8	8.5±0.0	0.4±0.4	0.1±0.0	0.2±0.4	0.0±0.0
6	114.2±10.1	8.5±0.1	0.4±0.3	0.0±0.0	0.3±0.3	0.0±0.0
7	17.6±1.1	7.4±0.2	3.3±0.1	2.1±0.0	0.8±0.1	0.4±0.0
8	68.2±27.0	8.6±0.1	1.3±0.5	0.5±0.5	0.6±0.1	0.1±0.2
9	104.0±12.6	8.6±0.1	0.7±0.6	0.1±0.0	0.6±0.5	0.1±0.0
10	94.1±5.0	8.7±0.0	1.2±0.3	0.1±0.1	1.1±0.2	0.0±0.0
11	87.5±6.5	8.7±0.1	1.2±0.2	0.1±0.0	1.0±0.2	0.0±0.0
12	96.8±0.1	8.6±0.1	1.1±0.1	0.1±0.1	0.8±0.0	0.0±0.0
13	82.3±7.3	8.5±0.1	1.2±0.1	0.1±0.1	0.9±0.1	0.1±0.1

Tableau 5-7: Observation values of the experimental design at day 273.

5.1.3.7.2.2 Effect of the operating factors on the final products of AD

Tableau 5-8 shows the calculated coefficients of two final responses modeling: CH_4 production and VFA concentrations. First, the model based on methane production was statistically correct, since statistical analysis indicates that the model is very significant (p-value < 0.0005) and has a high coefficient of determination ($R^2 > 75\%$). Based on a detailed observation of the nine coefficients, five parameters have the main effects (positive or negative) on the final methane production (TS, TS-Size, S/X-TS, S/X and size). They are considered as predominant because they represented respectively 27, 17, 12, 10 and 8% of the final response with significant p-values (always < 0.05). Among these five parameters, the TS content has the major influence on the CH_4 response, particularly because of the high values of its linear coefficient (-30.2 ***) and its interaction coefficients with size and S/X ratio (+19.1 *** and -12.7 *, respectively). These three coefficients represent 56% of the model description (27, 17 and 12% for TS, TS-Size and S/X-TS, respectively). The negative sign of the TS linear coefficient shows that increasing TS content affects the methane production negatively. The positive sign of interaction coefficient between TS and size suggests that larger particle sizes are suitable for high TS content operation. The negative interaction between TS content and S/X ratio shows that both high inoculation and high TS content are unfavorable for methane production. Linear coefficient of S/X ratio (-10.8 *) and size (+9.3 *) are significant but represent only 18% of the response. The negative sign of S/X coefficient indicates that increasing inoculation (X) is suitable to increase process performances, which is consistent with the literature (Cui *et al.*, 2011). However, a decrease of particle size affects

the methane production negatively, which is in contradiction with the majority of published works (Sharma *et al.*, 1988; Mshandete *et al.*, 2006; Lindmark *et al.*, 2012) but in accordance with a few authors (Izumi *et al.*, 2010).

	CH_4 ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	VFA ($mmol.g_{VS}^{-1}$)
Constant	80.6 ***	1.2 ***
S/X	-10.8 **	0.4 **
TS	-30.2 ***	0.7 ***
Size	9.3 *	-0.5 ***
S/X↔TS	-12.7 *	0.5 **
S/X↔Size	8.3	-0.1
TS↔Size	19.1 ***	-0.3
S/X^2	3.7	-0.1
TS^2	-9.1	0.3
$Size^2$	6.8	0.2
R^2	80.9%	74.4%
p-value	2.6E-07 ***	9.4E-06 ***

Tableau 5-8: Calculated coefficients of the main responses of the experimental design at day 273.
Methane production indicates the performances of the digestion. VFA accumulation reveals the potential failure of the condition. Signification codes: $p < 0.0005$ = ***; $p < 0.005$ = **; $p < 0.05$ = *.

In Figure 5-8, the modeled methane productions, represented by a response surface, are plotted as a function of TS content and S/X ratio for the three particle sizes. For each particle size, the methane production decreased gradually with an increase of TS content. The methane production was maximum (> 110 $NmL.g_{VS}^{-1}$) for a TS content of 15% (level -1) and a S/X ratio of 28 (level -1). For the coarse fraction (1.45 mm), no drastically unfavorable conditions were observed, with a methane production always higher than 70 $NmL.g_{VS}^{-1}$. For medium and fine particle sizes, an unfavorable area characterized by methane productions lower than < 50 $NmL.g_{VS}^{-1}$ was observed for high TS content (level +1) and high S/X ratio (level +1). The medium fraction (0.47 mm) presented a small unfavorable zone (14% of the domain) with a methane production lower than 50 $NmL.g_{VS}^{-1}$ for high TS content and high S/X ratio. This behavior was amplified for fine fraction (0.11 mm) and a large zone corresponding to unfavorable conditions (26% of the domain under 50 $NmL.g_{VS}^{-1}$ of methane) can be identified. However, fine fractions could lead to a maximum methane production higher than 110 $mL.g_{VS}^{-1}$ with 15% TS and a S/X ratio of 28. Within the range of TS tested (15 to 25% TS), the impact of TS content on methane production is progressive and no threshold identifying a limit between wet and dry digestion in other studies was detected (De Baere & Mattheeuws, 2010; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). The progressive reduction of AD performances suggests a decrease of substrate conversion into methane, which may be attributed to medium heterogeneities (Staley *et al.*, 2011).

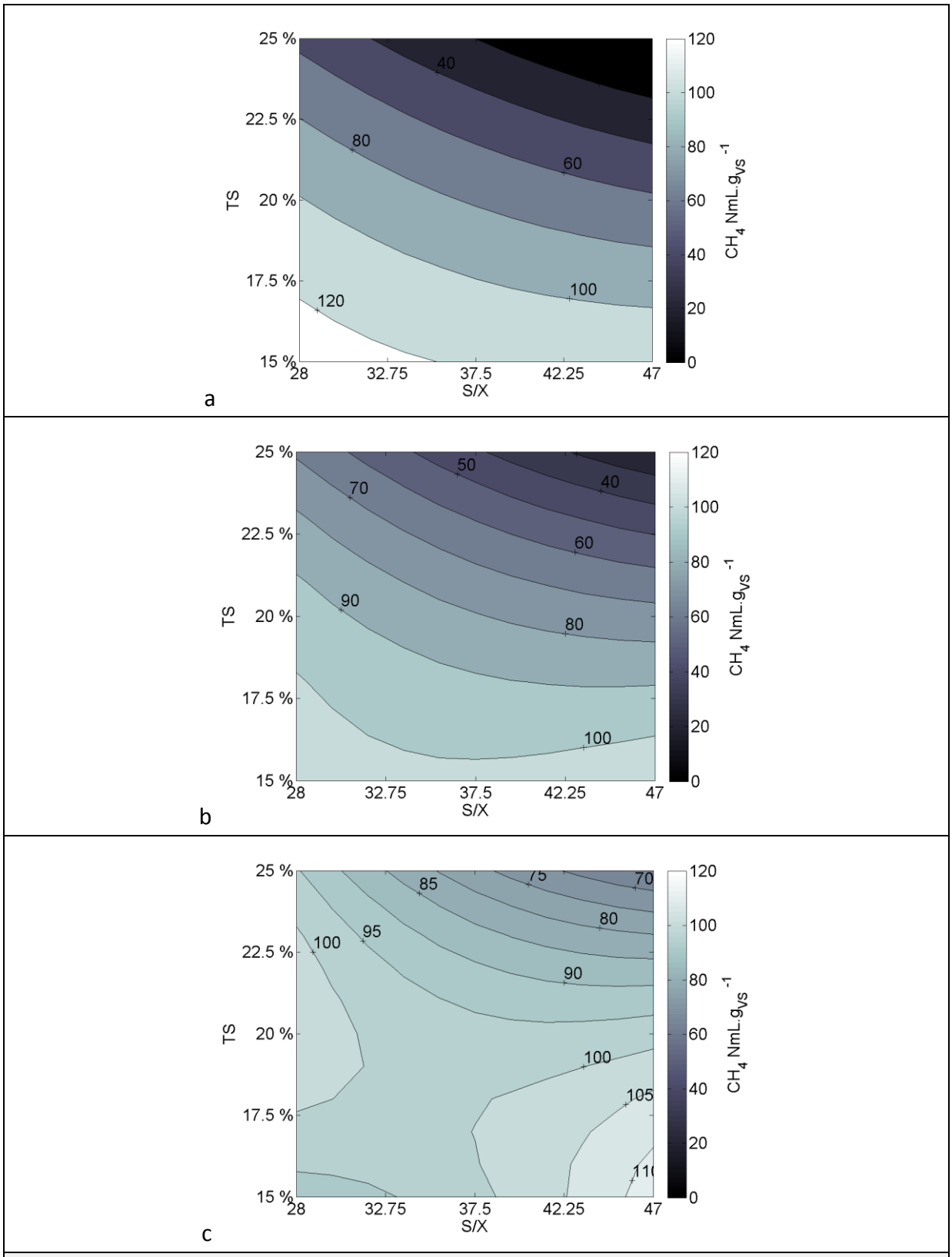


Figure 5-8: Surface responses of the methane production (NmL.g_{VS}^{-1}) at day 273 as a function of S/X ratio and TS content for three particle sizes in term of normalized factors. (a) Fine. (b) Medium. (c) Coarse fraction.

The final VFA accumulation (Tableau 5-7) was related to the final equilibrium of the system. Because VFA concentrations, which also affect the pH, are produced during the acidogenesis step of anaerobic digestion, their accumulation suggested a failure of the methanogenesis step and provided more specific information about the process behavior (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). As reported in Tableau 5-7, when SS-AD failed, the distribution of VFA indicated a disturbance of acetogenesis and methanogenesis pathways (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). This failure of AD processes conducted to an accumulation of both acetic and butyric acids resulting from fermenting pathways (Guo *et al.*, 2010), and propionic acid which is known to be difficult to degrade (Vavilin *et al.*, 1996). The analysis of the model factors (p-value < 0.0005 and R^2 = 74.4%) indicates a trend similar to the model based on methane production response, *i.e.* a strong and significant influence of TS content (+0.7 ***), interaction TS-S/X (+0.5 ***), particle size (-0.5 **) and S/X ratio (+0.4 **). Therefore, increasing TS content or S/X ratio enhanced the risk of VFA accumulation. Furthermore, the results indicated that operating with a fine fraction increases the potential of VFA accumulation and induced a system failure even if this fraction showed the highest methane potential under appropriate conditions.

In the range of the tested conditions, fine fraction showed not only a high tendency of AD failure for low inoculation but also the highest potential of CH_4 production under appropriate conditions. This paradox can be attributed to the presence of easily degradable compounds within the soluble fraction, which were rapidly metabolized into fermentative products. Indeed, fine fraction present higher soluble fraction than medium and coarse fractions (Tableau 5-6). Therefore, methanogenic microorganisms were rapidly submitted to high concentrations of inhibitive compounds produced by fermentation, which inhibited their activity and so conducted to a failure of anaerobic digestion (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Because of high S/X ratios, the quantity of microorganisms was too low to be able to degrade the initial fermentative products related to the soluble fraction (Liew *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012). This hypothesis was strengthened by the fact that acetogenic and methanogenic communities are sensitive and have lower growth rates than fermentative and hydrolytic populations (Shi *et al.*, 2013).

5.1.3.7.3 Effect of the operating factors on the dynamic behavior of AD

The methane production has been followed periodically during the whole experiments. An analysis of the experimental design for this entire period provides a dynamical analysis of the parameters influencing SS-AD. Figure 5-9 presents the coefficients for modeling the methane production during the 273 days of the experiment (averaged per range of 10 days). This temporal analysis of an experimental design provides novel and non-invasive information about the system behaviors that, to the authors knowledge, have never been studied before. The methane production rates of four typical experimental conditions are shown in Figure 5-10: observation 5 (15% TS, S/X of 28 and medium fraction) with early and high maximal CH_4 production, observation 1 (15% TS, S/X of 37.5 and fine fraction) with late and high maximal CH_4 production (120 days), observation 12 (20% TS, S/X of 28 and coarse

fraction) with late and low maximal CH_4 production (120 days) and observation 3 (25% TS, S/X of 37.5 and fine fraction) with an inhibition of methane production. In term of dynamics, a similar system behavior was obtained comparing to the literature, which suggests that the present system is representative of dry systems at higher inoculation despite a low inoculation (Cui *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). From Figure 5-9 and Figure 5-10, it is possible to identify three phases: the adaptation phase (from day 0 to day 40), the growing phase (from day 40 to day 140) and the stabilization phase (from day 140 to day 273). Similar phases were already observed during AD of solid organic matters inoculated by high S/X ratios (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Since the system response was strongly influence by the reaction stage, the critical point appears through the reaction dynamics.

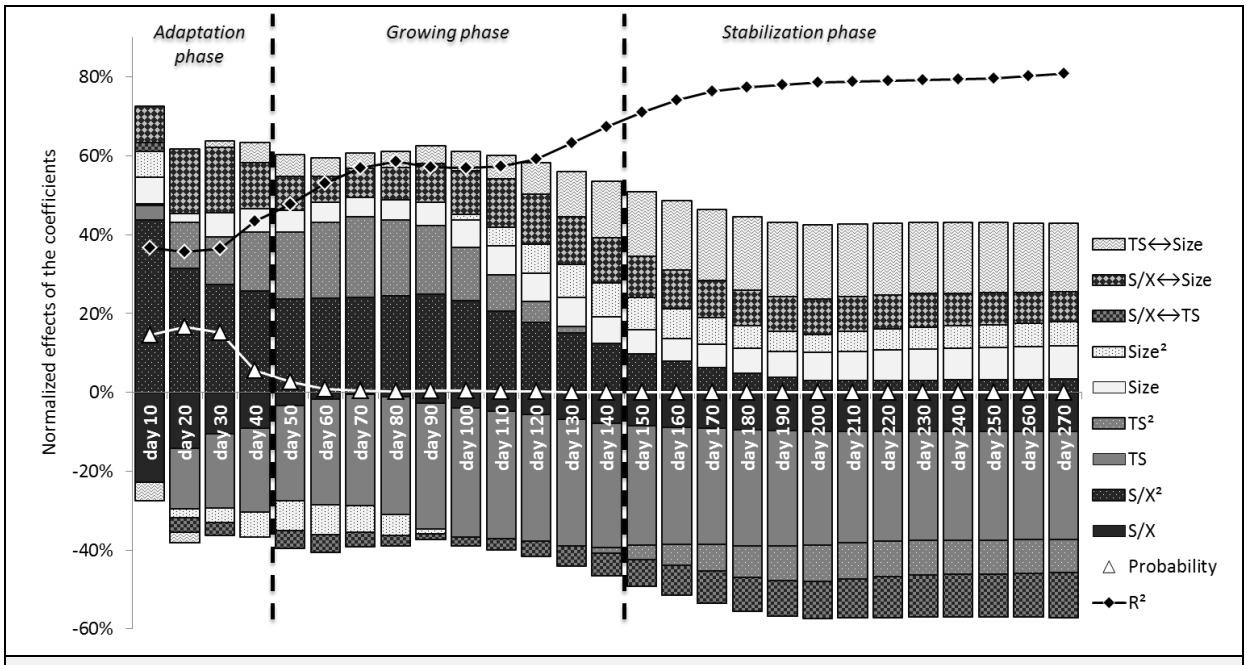


Figure 5-9: Dynamic variation of the factors coefficients modeling the methane production during the 273 days of the experiment.

Three phases are observed depending on the importance of the parameters: the adaptation phase (0 to 40 days), the growing phase (40 to 140 days) and the stabilization phase (140 days to the end). The model became significant at the end of the adaptation phase.

5.1.3.7.3.1 Adaptation phase

During the first 40 days, the AD was particularly unstable as revealed by the insignificant p-value (> 0.05) of the regression (Figure 5-9). Therefore, it was not possible to analyze precisely the magnitude of the coefficients during this period. However, a strong influence of S/X ratio (more than 30% of influence) and a progressive increase of TS coefficient with time (starting from zero to 25% of influence) are observed. The instability of the factors suggested a strong evolution of the ecosystem related to the microbial growth and adaptation to the experimental conditions. Two consecutive peaks of methane production rate were observed during this phase (Figure 5-10). A first peak could correspond to the initial transformation of the soluble phase, while a second peaks could be related to

the easily degradable compounds of hydrolysis. This period was associated to a low methane productivity, which is classically observed for low S/X ratio (Fernández *et al.*, 2001; Liew *et al.*, 2012). Therefore, the S/X ratio may drive the start-up phase of the anaerobic digester, probably because of an action of the methanogenic consortia on the degradation capacity of initial hydrolysis products. At the end of this period, a separation between favorable and unfavorable conditions of the experimental design was observed. This separation conducted to the progressive reduction of the effect of S/X ratio (from 40% down to 25% of the effect). The quality of the model prediction increases progressively with time, as indicated by the decrease of p-value (from 17 to 5%). The S/X ratio, expressed in terms of VS ratio, is an interesting parameter to favor a good SS-AD start-up. However, it is not a sufficient criterion because both substrate composition and inoculum structure co-affect the initial production of VFA. Therefore, a better indicator should be defined to include, for example the soluble phase of the substrate and the activity of the inoculum (e.g., the ratio of methanogens to bacteria or the specific methanogenic activity).

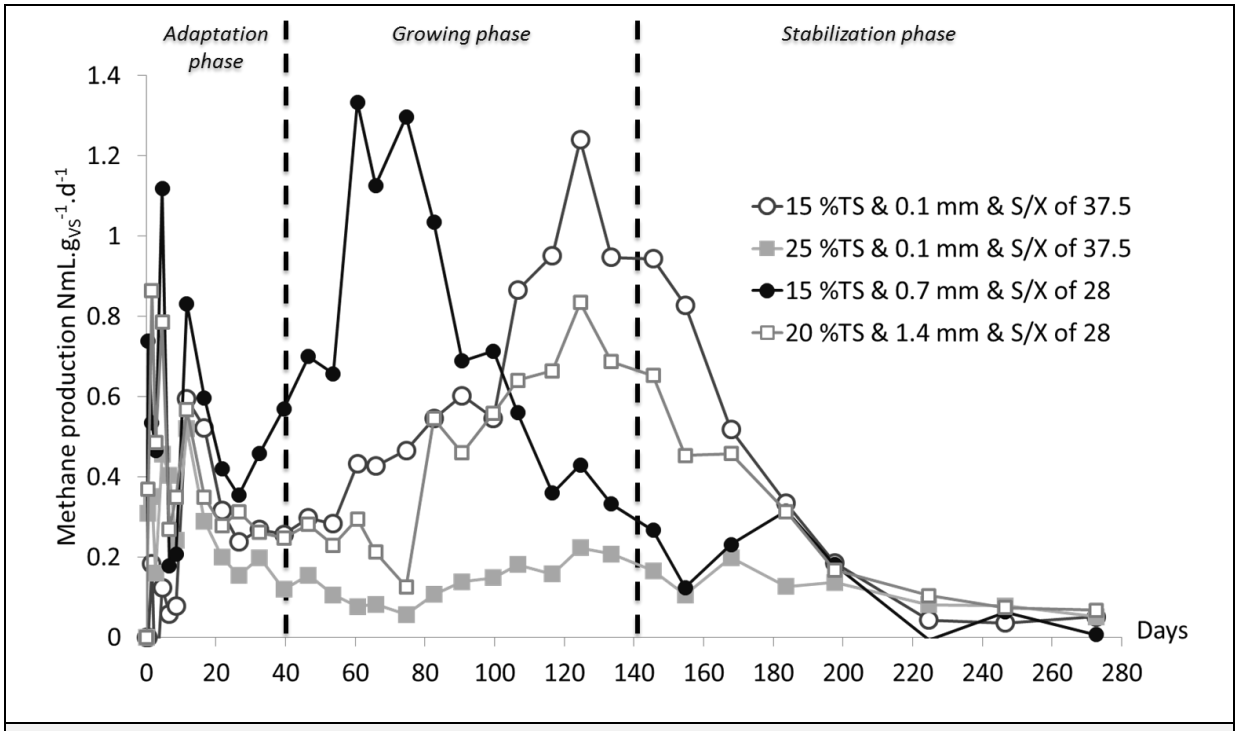


Figure 5-10: Examples of dynamical variation of methane production rate for 4 experimental conditions.

5.1.3.7.3.2 Growing phase

The growing phase (day 40 to day 140) corresponds to the differentiation between favorable and unfavorable conditions, which is reinforced during the growing phase. The model quality increases with time since the p-value becomes significant after 40 days (< 0.05) and the coefficient of determination R^2 gradually increases from 50 to 75%. An initial high S/X ratio increases the duration of the adaptation phase between the experimental conditions (Fernández *et al.*, 2001) and conducts to large differences of date of maximal transformation rate (from day 60 to day 120) (Figure 5-10). TS content becomes the main

factor driving AD reaction in the growing phase (21% at day 40 to 32% at day 140), instead of S/X ratio during the adaptation phase. It is important to notice that the quadratic coefficient of TS content has a high value at the beginning of this period, meaning that the range of TS contents tested was not correctly centered during the growing phase. However, this critical TS content moved progressively towards the center of the study area because of the decrease in the quadratic TS coefficient (from 17% at day 50 to 1% at day 140). TS content is related to important limitation phenomena, such as mass transfer (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), rheological behavior (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b), heterogeneity at both microscopic and macroscopic scales (Staley *et al.*, 2011) or dilution of inhibitory compounds (Pommier *et al.*, 2007). These limitation phenomena may become relevant during the growing phase.

5.1.3.7.3.3 Stabilization phase

The stabilization phase occurred from day 140 to the end of the experiment. During this whole phase, the model is highly significant (p-value < 0.05) and the coefficient of determination increases gradually to reach 80%. The analysis of the model coefficients indicates that, from the beginning of the stabilization phase (day 140), the system response has the same profile as the final response previously described (see section 5.1.3.7.2.2). The main parameter that drives SS-AD performances is the TS content. However, the positive interaction between TS content and particle size (around 20%) clearly shows that increasing both the TS content and particle size induces better performances. This strong interaction can be attributed to the rheology of the medium (Garcia-Bernet *et al.*, 2011b) and the water behavior which is modified by the particle size. Therefore, the TS content seems to be linked to an important phenomenon related to the water compartmentation (Pommier *et al.*, 2007).

5.1.3.8 Conclusions

This study provides novel information about the interaction and the dynamic behavior of the dry AD. As indicated by the responses of the experimental design, the S/X ratio is the main factor that drives the start-up of the SS-AD reactions since it allows the system to face the initial fermentative products production. After the start-up phase, TS content becomes the predominant factor associated to particle size. This supposes that TS content and particle size adjustment could optimize the control and the performances of dry AD plant probably through an action on the water compartmentation.

5.1.3.9 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the University of Montpellier 2 for JC Motte PhD financial support. They also thank D. Jackowiak for his help in the choice of the experimental design and Nathalie Lanson-Thompson for English proofreading.

5.1.4 DISCUSSIONS DU CHAPITRE 5.1

Les deux sections de ce chapitre ont permis de mettre en évidence des paramètres clés influant sur la digestion anaérobie : l'hétérogénéité du substrat, la taille des particules, l'inoculation et la teneur en matières sèches.

5.1.4.1 Caractérisation du substrat

5.1.4.1.1 Effet de la granulométrie

Trois tailles de particules ont été préparées pour cette thèse (matériels et méthode) et caractérisées finement. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5-9.

Granulométrie	Fine	Moyenne	Grosse	p-value
Taille moyenne (mm)	0,11	0,67	1,45	Nd.
Surface spécifique ($g.cm^{-2}$)	1,45	0,78	0,12	Nd.
MS (%) [1]	94%±1	95%±2	93%±1	1,6e-2 *
MV (%) [1]	86%±1	89%±2	87%±1	1,7e-4 ***
MM (%) [1]	7%±1	6%±1	6%±1	7,6e-5 ***
MV/MS	92%±1	93%±1	93%±1	1,5e-5 ***
Soluble eau (%)	18%±5	6%±2	5%±2	4,4e-4 ***
Soluble NDF (%)	9%±3	7%±3	5%±2	> 0,05 ns
Hémicelluloses (%)	28%±3	32%±3	32%±2	> 0,05 ns
Cellulose (%)	37%±3	50%±3	51%±2	9,5e-5 ***
Lignines (%)	7%±2	6%±2	7%±1	> 0,05 ns
Cellulose cristalline (%) [2]	45%±6	36%±12	52%±9	8,9e-4 ***
Glucose (%)	33%±5	34%±5	34%±5	> 0,05 ns
Xylose (%)	21%±4	22%±5	21%±5	> 0,05 ns
Arabinose (%)	2%±1	2%±1	2%±1	> 0,05 ns
Arabinose/Xylose	10%±2	8%±1	9%±1	> 0,05 ns
NTK (%)	0,1%±1	0,1%±1	0,1%±1	> 0,05 ns
COT (%)	42,3%±1	42,7%±1	43,1%±1	3,9e-2 *
C/N	164±11	427±87	255±52	> 0,05 ns
BMP ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	233±29	199±12	225±4	2,0e-2 *
BHP ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	34±2	9±3	6±1	1,0e-6 ***

Tableau 5-9 : Caractérisation des trois tailles de particules.
Tous les pourcentages sont exprimés en matières volatiles à l'exception de : (1) pourcentage de paille brut et (2) pourcentage de la cellulose. Les analyses de variance sur la taille moyenne n'ont pas été réalisées à cause des variations de la méthode de mesure, tandis que celles des surfaces spécifiques vient de l'absence de répétitions de l'analyse.

La taille moyenne des particules a été évaluée par granulométrie laser ou tamisage. Or, ces évaluations sont imprécises dans le cas des matériaux fibreux. En effet, la granulométrie laser conduit à assimiler les particules à une sphère dont la taille estimée varie en fonction

de l'angle selon lequel la particule se présente face à la cellule de mesure. Le tamisage implique un passage vertical des particules dans les tamis de mesure. Une sous-estimation des tailles moyennes des particules fibreuses est donc régulièrement observée (Vaezi *et al.*, 2013). Par conséquent, les trois granulométries étudiées durant cette thèse présentent de fortes différences entre les tailles des tamis de broyage utilisés et détermination de la taille moyenne des particules : 0,11, 0,67 et 1,45 mm mesurés pour des broyages à 0.25, 1 et 10 mm respectivement. Puisque le broyage augmente la surface spécifique des substrats (Barakat *et al.*, 2013), les surfaces accessibles des trois granulométries ont été mesurées par adsorption et désorption d'azote, respectivement à 1,45, 0,78 et 0.12 $g.cm^{-2}$. Les différences sur cette mesure sont importantes, mais le seuil de significativité de l'appareil employé est situé à 1 $g.cm^{-2}$. Par conséquent, hormis pour la granulométrie fine, les surfaces mesurées sont considérées comme imprécises. Néanmoins, l'écart entre les trois granulométries est régulier, que ce soit par rapport à la valeur mesurée (0,11, 0,67 et 1,45 mm), à la surface spécifique (1,45, 0,78 et 0.12 $g.cm^{-2}$) ou au pas du tamis de broyage retenu (0,25, 1 et 10 mm). Cette régularité résulte d'un choix stratégique pour cette thèse.

Les matières sèches, volatiles et minérales des trois granulométries sont significativement différentes. Ces variations sont attribuables au protocole de préparation. En effet, les broyages fins ou lents échauffent la matière augmentant ainsi la teneur et matières sèches du substrat. De plus, le tamisage des granulométries moyenne et grossière peut également éliminer de fines poussières minérales, tandis qu'elles sont conservées lors de la préparation de la granulométrie fine. Néanmoins, les trois granulométries présentent des teneurs en matières sèches, organiques et minérales dans un même ordre de grandeur (93 à 95% MS, 86 à 89% MV et 6 à 7% de cendres). Le fractionnement de type Van Soest, indique que la phase soluble du substrat est très importante pour la granulométrie fine (≈ 27% de la matière organique contre 10 à 12% pour les granulométries moyenne et grossière). Cette observation est en accord avec la littérature sur l'effet du broyage (Tamaki & Mazza, 2010). L'augmentation de la phase soluble est réalisée au détriment de la cellulose et dans une moindre mesure des hémicelluloses. Ainsi, la cellulose est le polymère le plus fortement impacté par le broyage, probablement en raison de son imbrication plus faible avec les lignines, comparée aux hémicelluloses. Ceci confirme que les parois végétales des substrats sont déstructurées par les broyages fins (Barakat *et al.*, 2013). De plus, la réduction granulométrique n'impacte pas la composition en sucres (glucose, xylose et arabinose) puisque leur distribution est similaire pour les trois tailles de particules. Ces sucres peuvent être inclus dans la fraction soluble du substrat et donc ne plus être considérés comme faisant partie de la cellulose ou des hémicelluloses. Toutes ces observations confirment que le broyage correspond à une déstructuration physique de la matière (solubilisation) sans impacts sur la composition biochimique (Silva *et al.*, 2011; Barakat *et al.*, 2013).

Enfin, l'analyse de certaines caractérisations est limitée par des considérations techniques. Le ratio C/N est statistiquement similaire pour les trois granulométries. Ceci s'explique par une grande erreur de mesure sur ce ratio, notamment liée à la très faible

teneur en azote de la paille. Ainsi, il n'est pas possible de trancher sur un éventuel impact du broyage sur le ratio C/N. Egalement, l'absence de broyage complémentaire des granulométries conduit à des limitations analytiques sur certaines caractérisations. En particulier, la détermination de la cristallinité de la cellulose, reposant sur un spectre infrarouge (FTIR), ne peut être considéré comme fiable puisque la mesure est réalisée sur une faible surface dépendante de la granulométrie. Par conséquent, la cristallinité de la cellulose, malgré une significativité statistique, ne peut pas être considérée comme différente entre les trois tailles de particules.

La granulométrie moyenne présente un potentiel méthane inférieur (199±12 NmL.g_{MV}^{-1}) aux deux autres tailles des particules (233 et 225 NmL.g_{MV}^{-1} pour les granulométries fine et grossière). Cette observation est contradictoire avec la littérature où la réduction granulométrique augmente généralement le potentiel méthane dans cette gamme de broyage (Sharma *et al.*, 1988). Puisque ces potentiels méthane ont été évalués simultanément, il n'est pas possible d'attribuer cette différence à une variation d'inoculum ou de protocole (Raposo *et al.*, 2009). Concernant le potentiel hydrogène, une différence importante et significative est observée. Ainsi, la granulométrie fine présente un potentiel hydrogène de 34±2 NmL.g_{MV}^{-1}, contre moins de 10 NmL.g_{MV}^{-1} pour les granulométries moyenne et grossière. Cette différence est attribuable à la proportion de phase soluble très importante pour la granulométrie fine (> 25% de la matière organique) qui est fortement corrélée au BHP du substrat (Monlau *et al.*, 2012b).

%C	%H	%O	%N	%S	BMP Buswell (NmL.g_{MS}^{-1})	DCO (g_{DCO}.g_{MS}^{-1})
42,61%	5,87%	42,08%	0,39%	0,05%	412	1,19

Tableau 5-10 : Analyse élémentaire de la paille de blé.

Enfin, l'analyse élémentaire de la paille est présentée dans le Tableau 5-10. Cette caractérisation permet d'estimer le potentiel méthane théorique selon la formule de Buswell. Cette équation indique une production théorique de méthane de 412 NmL.g_{MS}^{-1} (≈ 460 NmL.g_{MV}^{-1}), pour une DCO théorique de 1,19 g_{DCO}.g_{MS}^{-1}. Cette valeur purement théorique ne peut être atteinte dans les faits, en raison de la présence de composés non biodégradables (lignines et cellulose cristalline par exemple). Néanmoins, elle indique que la biodégradabilité des pailles (ratio en BMP mesuré et BMP théorique) est de l'ordre de 45%.

5.1.4.1.2 Caractérisation de la paille vis-à-vis de la littérature

La granulométrie moyenne, est la plus comparable avec la littérature, puisque les broyages de la paille au millimètre sont les plus souvent retenus (Chesson *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2010). Les données de la paille de littérature et de la granulométrie moyenne ont été respectivement présentées dans les discussions (Tableau 5-9) et le chapitre bibliographique (synthèse bibliographique). Pour établir une comparaison entre la paille utilisée au cours de cette thèse et la bibliographie, les valeurs de la littérature ont été

centrées réduites. Ces valeurs définissent un intervalle incluant les caractérisations de la littérature et auxquelles est ajoutée la granulométrie moyenne représentée par un point noir (Figure 5-11). Cette représentation permet de vérifier si la paille sélectionnée dans la thèse est considérée comme une valeur extrême vis à vis des pailles de blé de la littérature.

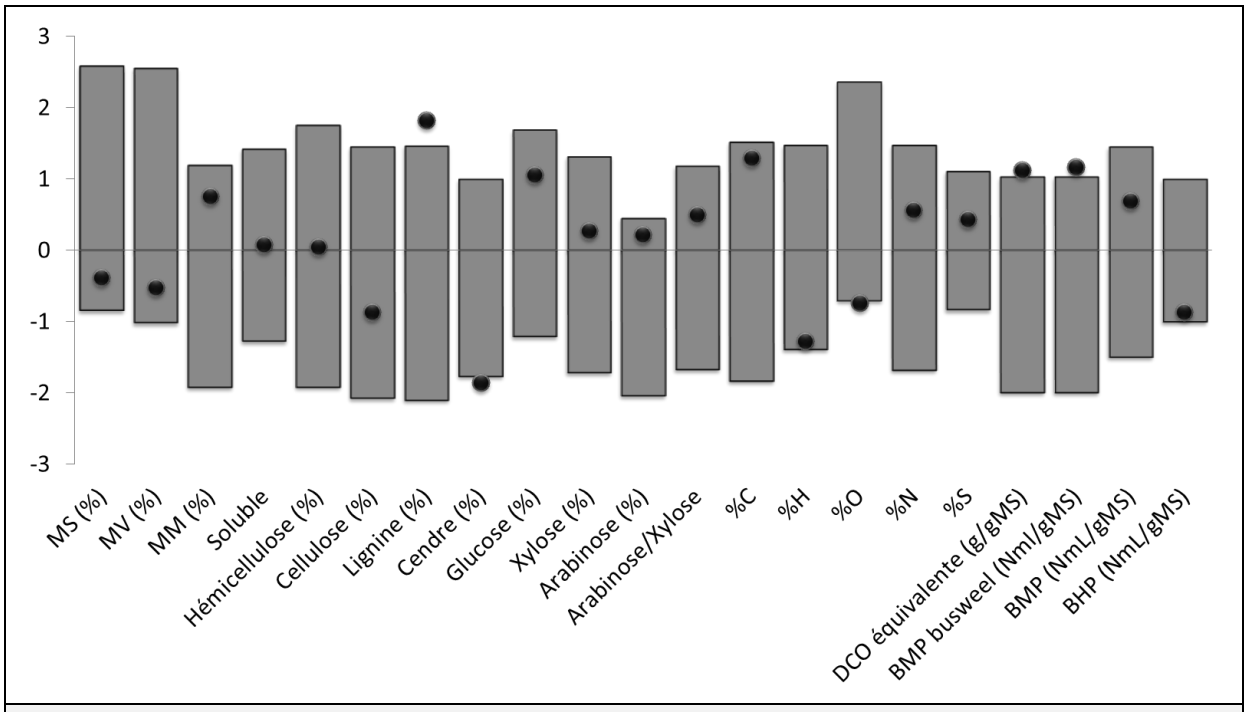


Figure 5-11 : Positionnement de la paille de blé de la thèse vis-à-vis des caractérisations de la littérature.

Les différentes caractérisations sont exprimées en variables centrées réduites à partir des donnés synthétisées dans la bibliographie. Les points représentent la caractérisation de la paille de la thèse.

Ainsi, les teneurs en matières sèches, volatiles et minérales sont comparables à la littérature (Han *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011). La composition de la lignocellulose confirme que la paille est un substrat de type CHL (Vassilev *et al.*, 2012) avec une phase soluble d'environ 12% (Harper & Lynch, 1981; Bertrand *et al.*, 2006). Le ratio arabinose/xylose mesurée à 8% confirme une bonne digestibilité des hémicelluloses (Bertrand *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2012). Seules les teneurs en lignines et en cendres sont éloignées de la littérature (5%±2 de lignines et 11%±1 de cendres contre 15%±5 et 7%±3 dans la littérature). Les BMP et BHP se trouvent dans la gamme des travaux déjà publiés, avec des productions de méthane de l'ordre de 200 $NmL.g_{MV}^{-1}$ (Sharma *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2012; Sambusiti *et al.*, 2013) et d'hydrogène de l'ordre de 10 $NmL.g_{MV}^{-1}$ (Quéméneur *et al.*, 2012a). Enfin, la DCO et le BMP théorique de la paille, dépendant de l'analyse élémentaire, sont légèrement différents de la littérature. Puisque ce type de représentation s'améliore avec le nombre de sources, la faible quantité de données pour certaines analyses (BHP et analyses élémentaires) permet de relativiser les différences entre la littérature et la paille de la thèse. Par conséquent, cette paille de blé est globalement semblable à celles décrites dans la littérature. Les quelques différences observées peuvent s'expliquer par la variabilité des

pailles de blé lié aux différences de variétés, de stades de croissance, de stockages et de modes de broyage (Rincón *et al.*, 2010; Barakat *et al.*, 2013).

5.1.4.1.3 Effet de l'hétérogénéité du substrat

Pour la première fois, l'effet des variations morphologiques de la paille de blé a été étudié en voie humide. Les résultats de l'étude présentés dans la section 5.1.2, permettent de classer les fractions morphologiques en fonction de leur potentiel méthane : feuilles > rachis > glumes > entrenœuds > nœuds. La forte proximité des productions de méthane entre les fractions permet d'affiner ce classement à trois fractions : feuilles > épis > tiges. La caractérisation biochimique et la structure des substrats semblent liées à ces observations. Par exemple, la plus grande phase soluble des feuilles a considérablement accélérée le démarrage de la production de méthane. Or, l'observation microscopique des feuilles permet de mettre en évidence la présence de champignons microscopiques (Figure 5-12), probablement responsables d'une prédégradation partielle de la matrice lignocellulosique (Dinis *et al.*, 2009). Enfin, les entre-nœuds et nœuds présentent des potentiels méthanes similaires alors que leur composition est très différente (phase soluble notamment). Cette remarque est applicable aux glumes et rachis, correspondant aux résidus des épis.

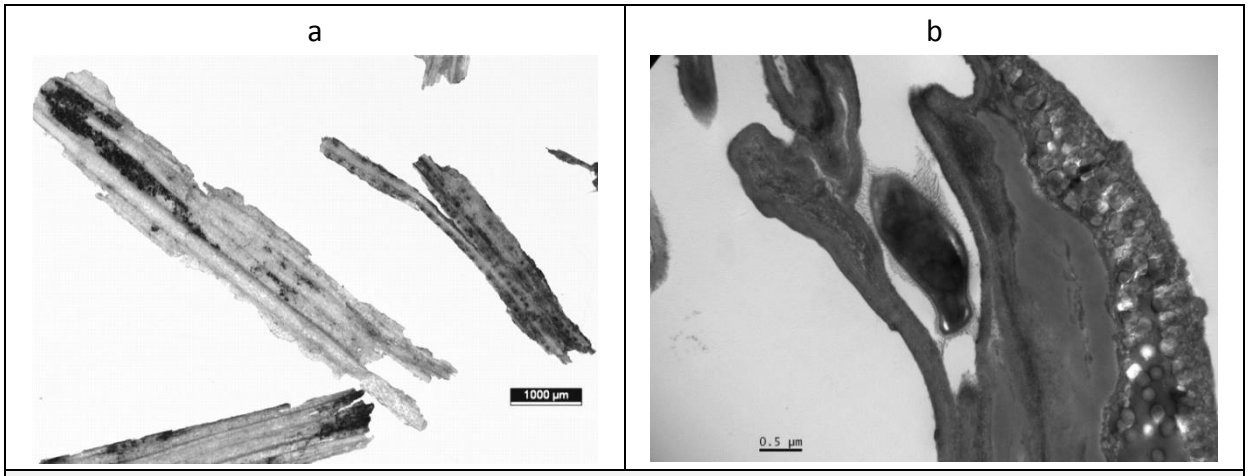


Figure 5-12 : Prédégradation des feuilles liée à la présence de champignons.
(a) Observation réalisée par stéréo-microscopie. (b) Observation réalisée au microscope électronique à transmission.

Toutes ces différences morphologiques, qu'elles soient biochimiques ou structurelles, impliquent des hétérogénéités dans le lot de paille qui peuvent avoir un impact local sur le fonctionnement des micro-organismes selon l'origine morphologique de la particule à dégrader. Selon cette hypothèse, les variations morphologiques ont potentiellement un impact important sur la digestion anaérobie par voie sèche. En effet, en raison des faibles teneurs en eau limitant la mobilité des micro-organismes, leur positionnement face à une structure organique facilement ou difficilement dégradable peut induire un comportement local particulier. Ainsi, Il est possible de supposer que les hétérogénéités du substrat impactent fortement l'homogénéité des milieux secs. Pour vérifier cette hypothèse, une caractérisation de l'impact la morphologie sur les hétérogénéités des milieux secs semble

donc être requise (limité aux tiges, feuilles et épis par exemple). Le broyage est à priori un moyen de contrer les hétérogénéités des milieux (Gy, 1992). Cependant, la réduction de la taille des particules n'augmente pas seulement l'homogénéité du milieu, mais induit plusieurs phénomènes complexes liés à la rhéologie du milieu, au transfert de matières, aux vitesses de dégradation et à l'accessibilité du substrat (Müller, 2003; Garcia-Bernet *et al.*, 2011b; Barakat *et al.*, 2013). Ces phénomènes peuvent avoir des effets complexes sur la dégradation qui restent à décrire en voie sèche.

5.1.4.2 Paramètres de procédé et dynamique de dégradation

L'étude de la section 5.1.3 a été mise en œuvre pour comprendre l'effet de plusieurs paramètres clés de la digestion sèche sur la dynamique réactionnelle: la teneur en matières sèches, le taux d'inoculation et la taille des particules. Les influences de trois facteurs principaux de la digestion sèche et leurs interactions sur la dynamique de la réaction ont été étudiées grâce à la méthodologie des plans d'expériences.

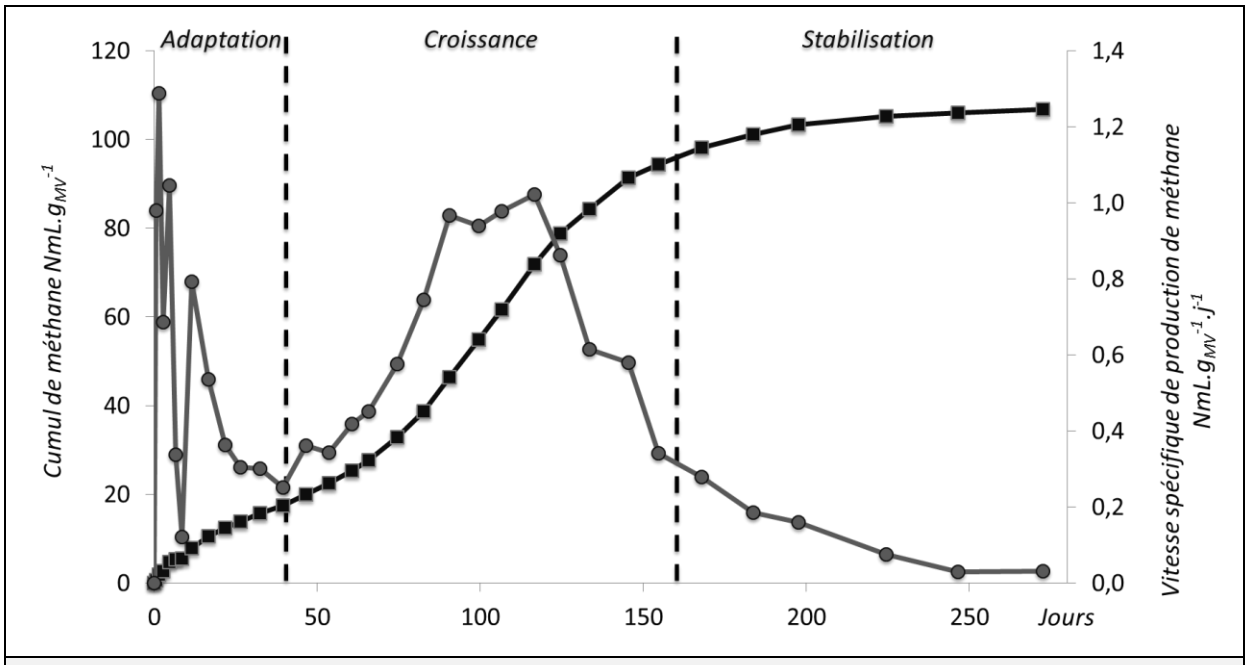


Figure 5-13 : Profil de production de méthane en voie sèche faiblement inoculé.
La production cumulée de méthane est associée à sa vitesse spécifique.

5.1.4.2.1 Dynamique de la réaction

L'étude montre que la dynamique réactionnelle en voie sèche suit un profil similaire à une courbe de croissance microbienne classique d'une réaction biologique conduite en mode discontinu (Figure 5-13). Aussi, malgré le faible taux d'inoculation, le profil de production de méthane est semblable à la littérature (Le Hyaric *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013), où plusieurs phases sont mises en évidence par la vitesse spécifique de production de méthane: adaptation, croissance et stabilisation (Figure 5-13). Si le profil de production est similaire, la durée de la réaction est considérablement augmentée à plus de 250 jours.

Certains phénomènes sont néanmoins observés sur la dynamique réactionnelle. Tout d'abord, un premier pic de production de méthane est observé durant les 7 premiers jours de la réaction, suivi d'un autre vers le 15ème jour. Ces pics de production sont observés quelles que soient les conditions (favorables ou défavorables). La description de ces pics sera abordée dans les chapitres 5.3 et 5.4. Ainsi, le faible taux d'inoculation allonge principalement la durée de la réaction mais impacte peu le profil de production de biogaz.

5.1.4.2.2 Démarrage des digesteurs

Au démarrage des digesteurs, les conditions expérimentales conditionnent leur résistance à l'acidification. Ici, puisque le domaine d'étude est centré sur les zones défavorables de chaque facteur, l'acidification de certains digesteurs a été volontairement observée. En particulier, deux conditions ont entrainé une forte inhibition caractérisée par une accumulation d'AGV supérieure à 35 g.kg^{-1} (conditions 3 et 7). L'acidification survient lors de la transformation des composés facilement fermentescibles du substrat en AGV (Staley *et al.*, 2011). Par conséquent, une quantité importante de métabolites est rapidement produite lors du démarrage de la réaction biologique (Shi *et al.*, 2013). Pour éviter l'acidification, plusieurs pistes sont envisageables : réduire la production initiale de produits de fermentations, améliorer la tolérance du milieu à l'acidification, agir sur le profil métaboliques du milieu pour limiter les inhibitions (section 5.2), favoriser la dégradation par les étapes d'acétogenèse et de méthanogenèse.

Le taux d'inoculation semble être le paramètre principal pour assurer le démarrage du digesteur. Son rôle, prépondérant sur la mise en place de la réaction, est mis en évidence par l'analyse du plan d'expérience. L'inoculation permet d'apporter une quantité suffisante de micro-organismes acétogènes et méthanogènes aptes à consommer le flux de métabolites produits. Par contre, l'inoculation n'impacte pas la production finale de méthane, si le démarrage est assuré. Par conséquent, le taux d'inoculation semble devoir être ajusté en fonction de la fraction la plus accessible du substrat. Une définition bâtie autour de la part de substrats facilement fermentescibles et la part de biomasse méthanogène pourrait donc être envisagée pour caractériser le démarrage des digesteurs.

Les composés facilement fermentescibles du substrat proviennent essentiellement de la phase soluble des substrats (Monlau *et al.*, 2012b) qui est accrue avec la réduction granulométrique (Tamaki & Mazza, 2010). Dans cette expérience les broyages fins augmentent le risque d'acidification des digesteurs tandis que le gain de méthane semble modéré (Figure 5-14). Par conséquent, le broyage poussé du substrat ne semble pas avantageux en digestion par voie sèche.

Enfin, les concentrations en métabolites sont supérieures à celles observées dans la littérature (Staley *et al.*, 2011). Pourtant, le pH est maintenu à un niveau supérieur à la neutralité. Ceci confirme que l'alcalinité du milieu est un facteur clé en digestion sèche (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b). L'alcalinité du milieu dans les conditions

opératoires de la thèse est importante et suffisante pour supporter un flux important de métabolites.

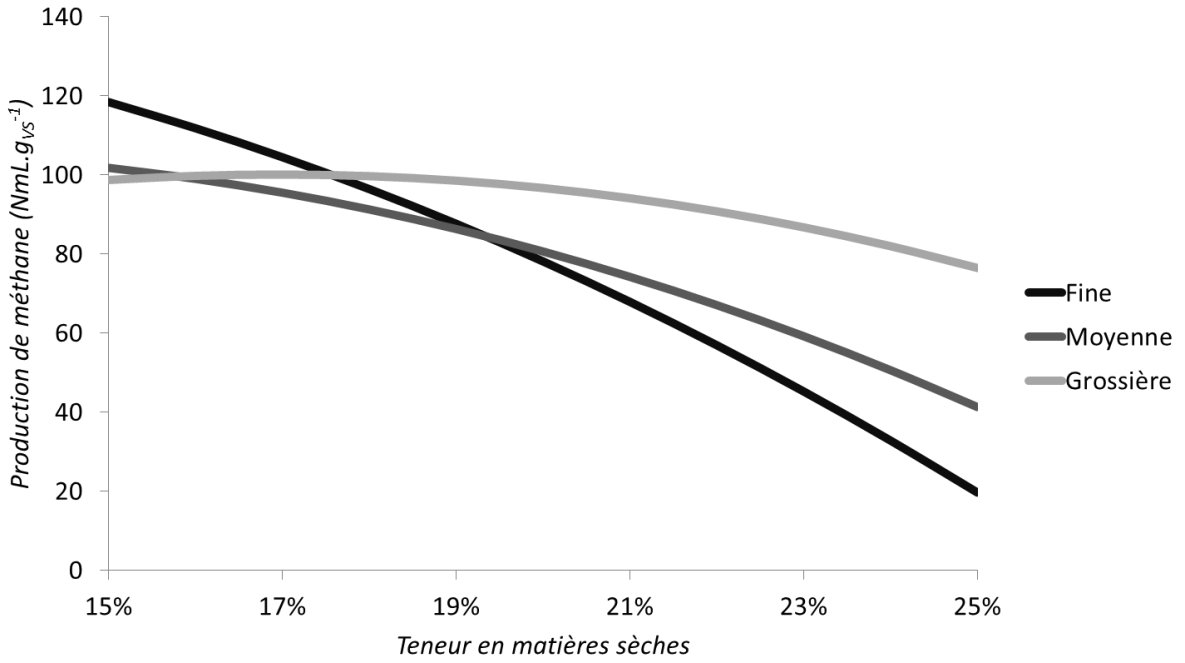


Figure 5-14 : Evolution des performances de la méthanisation sèche entre la voie humide et la voie sèche.
Les courbes sont représentées pour des S/X de 37,5 (niveau zéro du plan d'expérience).

5.1.4.2.3 Performances du procédé

Après démarrage correct de la réaction, les performances du procédé semblent principalement dépendantes de la teneur en matières sèches. Ce paramètre, seul ou par son interaction avec la taille des particules, conditionne l'essentiel de la réponse du procédé. Cette étude informe donc sur le rôle prépondérant de la teneur en liquide dans le milieu. La frontière entre voie humide et voie sèche est principalement décrite par l'augmentation des teneurs en matières sèches (Figure 5-14). Cette transition est donc progressive confirmant ainsi les observations de littérature (Le Hyaric *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Cependant, le fait que la taille des particules impacte fortement la limite entre voie humide et voie sèche suggère que cette transition est dépendante du substrat. Ceci explique sans doute l'absence de consensus sur les limites de la voie sèche (Bolzonella *et al.*, 2003; De Baere & Mattheeuws, 2010; Brown *et al.*, 2012). De plus, l'effet de la teneur en matières sèches est très faible lors du démarrage de la réaction. Ceci suggère que les premières phases de la réaction biologique ne sont pas limitées par les faibles teneurs en eau dans la gamme d'étude.

Enfin, les performances de cette expérience ont été plutôt faibles en regard du BMP de la paille. Ceci peut sans doute s'expliquer par l'absence d'optimisation du procédé (agitation notamment) et la très faible inoculation retenue. Il en résulte une forte concentration

résiduelle en AGV, même dans les conditions favorables. Ainsi, que ce soit en raison du risque d'acidification, du temps de réaction, ou des faibles productions de méthane, de telles conditions d'inoculation ne sont pas recommandables à l'échelle industrielle. Cette étude est surtout à vocation académique et dédié à l'explication des effets des paramètres de procédé sur la DA sèche.

5.1.4.2.4 Conclusions

L'objectif de cette étude est d'ajuster les paramètres de procédé afin de permettre de bonnes performances en fonction de la stratégie d'étude de la thèse (faible inoculation notamment). Au regard des résultats, plusieurs enseignements ont été apportés pour les futurs expérimentations de la thèse:

- L'alcalinité est suffisante pour tolérer un fort pic d'AGV.
- L'inoculation est à ajuster au niveau bas de la gamme (S/X < 28).
- La granulométrie fine ne peut pas être étudiée avec de faibles inoculations.
- La fermentation constitue une étape clé pour le démarrage des digesteurs.

Enfin, cette expérience a permis d'obtenir un modèle de dynamique réactionnelle pour ajuster le planning d'échantillonnage lors de l'étude dynamique de la digestion sèche (chapitres 5.3 et 5.4).

5.1.5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5.1

Ce chapitre a permis de mieux maitriser les paramètres de procédés pour une dégradation efficace du substrat lignocellulosique en condition sèche. Dans cet objectif, plusieurs paramètres de procédé ont été étudiés indépendamment ou simultanément. L'étude de l'hétérogénéité du substrat à l'échelle macroscopique (section 5.1.2) a permis de montrer un impact de la morphologie sur la dégradation anaérobie. Leur rôle est supposé important en voie sèche en raison de la faible teneur en phase liquide. Le broyage peut théoriquement réduire ces hétérogénéités par une réduction de la taille des particules. Cependant, l'étude montre qu'en voie sèche, la réduction granulométrique augmente les risques d'acidification des digesteurs en raison d'une part facilement accessible du substrat trop importante (section 5.1.3). Ce point soulève donc l'importance de la gestion du flux de métabolites initial, de l'alcalinité pour maintenir un pH stable dans le milieu de la fermentation. Puisque l'acidification est causée par la transformation des produits facilement fermentescibles en AGV, la consommation de ces acides organiques par l'acétogenèse et la méthanogenèse doit être suffisante. Cette quantité est constante pour un substrat donné (après prétraitement). Par conséquent, le taux d'inoculation doit être ajusté pour permettre un apport suffisant de biomasse microbienne apte à contrer la production de métabolites. Il a été montré ici, que ce taux n'impacte pas directement le potentiel de production de méthane du substrat mais est critique pour assurer le démarrage des digesteurs. Une fois le démarrage de la méthanogenèse assurée, le système devient dépendant de la teneur et de l'état de l'eau. La baisse de performances associée à l'augmentation des matières sèches est progressive et dépendante du substrat, et est probablement liée au taux d'humidification du substrat. Ainsi, la phase liquide est au cœur de la conduite des digesteurs, et elle est à la fois dépendante de la quantité d'eau dans le milieu mais aussi des propriétés du substrat.

	Effet de la morphologie et du broyage	Interaction dynamiques
Message principal	Sélection des variétés et amélioration des techniques de récoltes pour valorisation des pailles en méthane.	Evolution progressive de l'importance des effets des paramètres de procédé sur la dynamique de digestion sèche.
Nouveautés	✓ Impact de la morphologie sur le potentiel méthane de la paille.	✓ Importance de la teneur en matières sèches. ✓ Taux d'inoculation important pour le démarrage des digesteurs ✓ Au démarrage, absence d'effet du taux de matières sèches entre voie humide et sèche. ✓ Broyages fins défavorables à la digestion sèche.
Confirmation de la littérature	✓ Importance de la phase soluble sur le démarrage. (Kamdem *et al.*, 2013) ✓ BHP de la paille faible sans prétraitement. (Quéméneur *et al.*, 2012a) ✓ Impact important du broyage sur la production d'hydrogène mais faible sur le BMP. (Izumi *et al.*, 2010)	✓ Transition entre voie humide et voie sèche progressive et dépendante du substrat. (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012) ✓ Phase soluble liée au démarrage des digesteurs secs. (Zhang *et al.*, 2007b) ✓ Alcalinité très importante en digestion sèche. (Xu *et al.*, 2013)
Hypothèses et perspectives	1) Ajustement de l'inoculation en fonction de la phase soluble des substrats. 2) Effet négatif du broyage sur la digestion sèche. 3) Impact de la morphologie sur les hétérogénéités des milieux secs. 4) Etude de la fermentation en voie sèche. 5) Prédégradation de la lignocellulose par des champignons.	

Tableau 5-11 : Synthèse des résultats du chapitre 5.1.

5.2 EFFET DE LA TENEUR EN MATIÈRES SÈCHES SUR L'ACIDOGENÈSE

Ce chapitre vise à étudier le comportement des micro-organismes fermentaires face à l'augmentation de la siccité. Dans cet objectif, l'activité fermentaire a été évaluée en conditions mésophile et thermophile sur une large gamme de teneurs en matières sèches allant de la digestion humide (≈ 10% MS) aux limites hautes de la digestion sèche (≈ 35% MS). L'analyse des produits de la fermentation et l'étude des communautés microbiennes a permis d'étudier le comportement des micro-organismes, acidogènes en particulier, face à l'augmentation de la teneur en matières sèches. Ce chapitre présente les principaux résultats qui ont été soumis dans deux journaux : « Biotechnology for biofuels » et « International journal of hydrogen energy ».

5.2.1 AVANT-PROPOS DU CHAPITRE 5.2

5.2.1.1 Contexte

Le chapitre précédent a mis en évidence l'évolution progressive de l'importance des paramètres de procédé au cours de la réaction biologique (section 5.1.3). Ainsi, la production de méthane en voie sèche semble fortement impactée par la teneur et le comportement de l'eau, tandis que le démarrage de la réaction biologique est surtout dépendant du taux d'inoculation. Son association avec la phase soluble des substrats conditionnent le risque d'acidification des digesteurs au démarrage. Les résidus lignocellulosiques agricoles, et en particulier la paille de blé, présentent une phase soluble importante (de l'ordre 12% de la masse) constituée de composés facilement assimilables : sucres, pectines, protéines, lipides et fines particules issues des parois cellulaires (Sun, 2010). Ces composés sont facilement transformés en acides organiques, alcools et hydrogène durant l'acidogenèse et l'acétogenèse et présentent un fort pouvoir inhibiteur (Siegert & Banks, 2005; Amani *et al.*, 2010). Une accumulation de ces composés dans le milieu et les inhibitions associées sont amplifiées par la réduction des teneurs en eau en digestion sèche (Staley *et al.*, 2011). De plus, les concentrations en composés inhibiteurs évoluent au cours de la réaction (Shi *et al.*, 2013). L'acidogenèse est donc une étape critique dans la réaction biologique puisqu'elle conditionne la production de métabolites devant être transformée par les étapes d'acétogenèse et de méthanogenèse.

Pour comprendre comment la teneur en matières sèches influe sur la digestion anaérobie, l'étude de son impact sur l'acidogenèse est requise. Cette étape liée à l'activité fermentaire, et donc associée à la production d'hydrogène par fermentation sombre (Shin *et al.*, 2004; Latrille *et al.*, 2011). La mise en œuvre de la fermentation consiste à conduire un digesteur en inhibant l'activité méthanogène et en plaçant le système en condition acide (Fan *et al.*, 2006). Par conséquent, les produits de la fermentation s'accumule dans le milieu puisqu'ils ne sont pas transformés en méthane. L'étude de ces métabolites permet alors d'étudier le comportement de la biomasse microbienne en terme de métabolisme exprimé pour dégrader le substrat (Aceves-Lara *et al.*, 2008).

Ainsi, deux expériences de fermentation par voie sèche ont été mises en place dans le but de comprendre le comportement des micro-organismes acidogènes face aux augmentations des teneurs en matières sèches. Ces études ont été réalisées en conditions mésophile et thermophile. L'effet de la teneur en matières sèches sur la fermentation de la paille de blé a été évalué sur une gamme allant de la voie humide (≈ 10% MS) aux limites hautes de la digestion sèche (≈ 35% MS) (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012, 2013). Malgré la littérature (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Le Hyaric *et al.*, 2012) et l'expérience du chapitre précédent (teneur de 15 à 25% MS, section 5.1.3), la frontière entre voie humide et voie sèche reste peu décrite en terme d'impacts de la teneur en matières sèches sur comportement microbien. Cette gamme fut donc retenue pour cette étude.

Un mélange d'inocula commun aux deux expériences a été préparé dans le but d'obtenir un inoculum possédant une forte diversité microbienne. Ce mélange a été préparé à partir de quatre digestats industriels (25% de MV provenant de chaque inoculum), dont l'activité méthanogène a été inhibée par prétraitement thermique. La production de biohydrogène en voie sèche discontinue n'étant que très peu référencée dans la littérature (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b), un protocole d'évaluation du potentiel hydrogène a été spécialement adapté aux faibles teneurs en eau à partir d'un protocole de fermentation sombre classique (Quéméneur *et al.*, 2012a) (matériels et méthode). Le suivi du biogaz a été réalisé automatiquement tandis que le milieu a été analysé en fin de réaction.

Ce mode de fonctionnement particulier implique néanmoins quelques contraintes. Tout d'abord, le choix d'une quantité de substrat constante et relativement importante (≈ 20 g) pour toutes les conditions est lié au faible potentiel biohydrogène de la paille de blé (≈ 10 NmL.g_{VS}^{-1}). Ainsi, pour mesurer une quantité potentiellement identique de biohydrogène (≈ 200 NmL) pour chaque condition, lissant ainsi les erreurs de mesure, l'utilisation d'une quantité constante de substrats pour toutes les conditions (teneur en matières sèches) a été retenu. Ceci implique néanmoins une variation du volume de milieu réactionnel et donc du ciel gazeux. Pour les conditions présentant un ciel gazeux plus important (fortes teneurs en MS), une erreur de mesure plus importante est relevée par effet de dilution du biohydrogène. La modification du volume de ciel gazeux peut également agir sur les inhibitions en hydrogène (Ahring *et al.*, 1995) ou encore sur les transferts de matières (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Ensuite, la quantité de tampon MES (acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic) introduite dans chaque fiole a été fixée vis-à-vis de la masse de substrat, et ainsi, une forte concentration apparente (environ 750 mmol.L^{-1}) est obtenue pour les conditions les plus sèches. Or, l'alcalinité est un facteur important en voie sèche (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b) et l'absence d'inhibitions de ce tampon pour des concentrations allant jusqu'à 1160 mmol.L^{-1} a donc été vérifiée sur des tests spécifiques : gamme de concentration allant de 100 à 1160 mmol.L^{-1}, le tout à 35% MS. Enfin, l'analyse du milieu est faite uniquement en fin de manipulation (11 et 14 jours) puisqu'il n'est pas possible de prélever un échantillon en cours de fermentation. Or, entre les fioles ayant atteint le pic de production d'hydrogène rapidement et la date à laquelle le milieu est analysé, plusieurs jours peuvent s'écouler. Cette différence implique une variation de la composition en AGV entre les conditions rapides et lentes d'une même expérience. Ce phénomène influe principalement sur l'acide acétique, provenant de la consommation de l'hydrogène par homoacétogenèse, et est donc pris en compte dans les discussions.

5.2.2 TOTAL SOLID CONTENT: A KEY PARAMETER OF METABOLIC PATHWAYS IN DRY ANAEROBIC DIGESTION

Jean-Charles MOTTE, Eric TRABLY, Renaud ESCUDIÉ, Nicolas BERNET, Jean-Philippe DELGENES, Jean-Philippe STEYER, Claire DUMAS*

INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

** Corresponding author: claire.dumas@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 76*

5.2.2.1 Abstract

In solid-state anaerobic digestion (AD) bioprocesses, hydrolytic and acidogenic microbial metabolisms have not yet been clarified. Since these stages are particularly important for the establishment of the biological reaction, better knowledges could optimize the process performances by process parameters adjustment. This study demonstrated the effect of total solid content (TS) on microbial fermentation of wheat straw with six different TS contents ranging from wet to dry conditions (10 to 33% TS). Three groups of metabolic behaviors were distinguished based on wheat straw conversion rates with 2200, 1600 and 1400 $mmol.kg_{VS}^{-1}$ of fermentative products respectively under wet (10 and 14% TS), dry (19 to 28% TS) and highly dry (28 to 33% TS) conditions. Furthermore, both wet and dry fermentations showed acetic and butyric acid metabolisms, whereas mainly a butyric acid metabolism occurred in highly dry fermentation. Substrate conversion was reduced with no changes of the metabolic pathways until a clear limit at 28% TS content, which corresponded to the threshold value of free water content of wheat straw. This study suggested that metabolic pathways present a limit of TS content for high-solid anaerobic digestion.

5.2.2.2 KeyWords

Biohydrogen; Dark fermentation; Fermentative metabolites; Moisture content; Lignocellulosic residues.

5.2.2.3 Highlights

- Three domains of TS content are proposed : wet, dry and highly dry
- Wheat straw microbial conversion is lower under dry conditions.
- Same metabolic pathways occurred from 10 to 28% TS.
- A clear metabolic shift exists at 28% TS.

5.2.2.4 Background

Nowadays, anaerobic digestion (AD) of agricultural waste such as manure and lignocellulosic residues represents an economical, environmental and societal opportunity to

produce massively renewable energy (methane and hydrogen) and agricultural amendment through a digestate of high agronomic quality (Cioabla *et al.*, 2012; Karthikeyan & Visvanathan, 2012). AD process is supported by complex microbial ecosystems capable of converting the organic matter into methane and carbon dioxide by following four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. Nowadays, AD bioprocess systems are mature technologies with constant development since the 90's (De Baere & Mattheeuws, 2010). Process design is mostly dependent of the waste characteristics which constraint the temperature (mesophilic or thermophilic), the configuration (one or two-stage reactors), or the feeding modes (mono-substrate or codigestion) (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; De Baere & Mattheeuws, 2010). Water content is known to be one of the most important parameters that can affect the whole process of anaerobic digestion (Forster-Carneiro *et al.*, 2008; Karthikeyan & Visvanathan, 2012; Le Hyaric *et al.*, 2012). Therefore, Total Solid (TS) content of the medium is usually used to define two types of processes: "wet digestion" for TS < 15% and "dry digestion" or "high-solid" TS > 15-20% (De Baere & Mattheeuws, 2010; Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Operating AD under dry conditions offers the advantage of reducing reactor size, liquid/solid separation systems and lowering energy consumption for bioprocess heating (Rapport *et al.*, 2008; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012).

Intrinsic advantages of dry AD bioprocesses have led to an early industrial development of digesters operated between 20 and 30% TS and up to 40% TS for some technologies (Rapport *et al.*, 2008). However, this technical development was mainly based on empirical knowledge. Among the few studies dealing with the effect of total solid content, Brown *et al.* (2012) showed significant differences in anaerobic kinetics between wet and dry digestion, but no impact on methane yields. The effect of TS content on AD was also reported with cardboard in Abbassi-Guendouz, *et al.* (2012) and residential area waste in Staley, *et al.* (2011). Both studies reported a similar strong inhibition of AD performances for TS higher than 30% with a failure in methane production through the accumulation of volatile fatty acids (VFA). The solid-state conditions favored the emergence of specific microorganisms (Li *et al.*, 2013). Abbassi-Guendouz, *et al.* (2013) observed the emmergence of specific fermenting species of *Clostridium* sp. in inhibited systems at high TS content. So far, the effect of TS content on dry microbial fermentation has rarely been evaluated. Only two studies compared the effects of a gradient of TS content (from 21 to 35% TS (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b) and from 10 to 35% TS (Robledo-Narváez *et al.*, 2013)) on biohydrogen production. Both concluded to a decrease of hydrogen production with an increase of TS content and the importance of alkalinity to buffer the media. However, these studies did not evaluate the impact of TS content on the metabolic pathways involved in dry conditions. Therefore, there is an important lack of knowledge on microbial fermentation metabolism related to the water content reduction.

Metabolic pathway	Equation n°	Type of fermentation	Reaction	Informative products
Hydrogen producing	31	Glucose fermentation	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	Acetic acid, Hydrogen
Hydrogen producing	32	Glucose fermentation	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Butyric acid, Hydrogen
Hydrogen producing	33	Propionic acid fermentation	$CH_3CH_2COOH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + H_2O + H_2$	Acetic acid, Hydrogen
Hydrogen consuming	34	Homoacetogenesis	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	Acetic acid
Hydrogen consuming	35	Propionic acid production	$C_6H_{12}O_6 + H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	Propionic acid
Other metabolism	36	Propionic acid and ethanol consumption	$CH_3CH_2OH + CH_3CH_2COOH \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2COOH + H_2O$	Valeric acid
Other metabolism	37	Butyric acid and ethanol consumption	$CH_3CH_2OH + CH_3CH_2CH_2COOH \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH + H_2O$	Caproic acid
Other metabolism	38	Glucose fermentation	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	Ethanol
Other metabolism	39	Glucose fermentation	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 2CO_2$	Lactic acid

Tableau 5-12: Main balance reactions presented in anaerobic microbial fermentation.
H_2-producing, H_2 consuming and other metabolites are produced during acidogenesis and reveal the use of the substrate. For a more efficient methanogenesis, H_2-producing pathways should be favored.
Adapted from (Stadtman *et al.*, 1949; Cord-Ruwisch *et al.*, 1988; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Guo *et al.*, 2010).

The first two steps of AD, *i.e.* hydrolysis and acidogenesis, are commonly considered as the limiting steps of solid waste degradation (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; Pommier *et al.*, 2007; Staley *et al.*, 2011). During these steps, several fermentative microbial pathways can be involved to degrade the organic matter (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b). Microbial fermentation consists in waste degradation to simple molecules that will be further used as substrate by methanogenic consortia (Guo *et al.*, 2010). As shown in Tableau 5-12, three categories of fermentative end-products are generated when methanogenesis is blocked or inhibited: (i) a biogas composed of H_2 and CO_2, (ii) by-products associated to hydrogen-producing pathways, *i.e.* acetic and butyric acid, and (iii) other metabolites of non-hydrogen generating pathways such as propionic, valeric, caproic acid, ethanol or lactic acids (Tableau 5-12) (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Guo *et al.*, 2010). Since acetic and butyric acid are easier to degrade than other VFA or organic acids (Guo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012), their production and distribution after acidogenesis can be very informative on the ability of the system to easily start-up. A butyric/acetic acid molar ratio of 1.5 is often considered as an indicator of a good operation of the microbial fermentation process (Guo *et al.*, 2010). Since hydrogen and its by-products, *i.e.* acetic and butyric acid, are easier to degrade, promoting their corresponding pathways could result in an improvement of methanogenesis kinetics (Vavilin & Lokshina, 1996). Consequently, the accumulation of non-hydrogen metabolites could lead to methanogenesis inhibition, and conditions favoring AD inhibition should be avoided (Wang *et al.*, 1999). The feasibility of treating wheat straw (WS), which is a model of lignocellulosic residues, in dry AD technology was previously demonstrated (Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012). The objective of this study is to investigate the impact of TS content on microbial fermentation pathways of wheat straw, from wet to dry conditions.

5.2.2.5 Results and Discussion

5.2.2.5.1 Effect of total solid content on acidogenesis microbial activity

5.2.2.5.1.1 Lignocellulose characterization

Wheat straw had an initial Total Solid content (TS) of 95.6%±0.7 and a Volatile Solid content (VS) of 88.9%±0.7. Wheat straw fiber analysis indicated the following fractionation (based on TS content): 9.4%±0.6 of soluble fraction, 33.0%±1.1 of hemicelluloses, 43.7%±1.3 of cellulose, and 6.4%±0.8 of lignin. The straw was composed of glucose, xylose, arabinose, lignin and ashes at 35.9%±0.3, 24.3%±0.7, 2.0%±0.0, 20.9%±0.2 and 3.4%±0.7 of TS, respectively. According to drying test results, the critical water content of the straw w_c was estimated at 2.4±0.2 $g.g_{TS}^{-1}$, which corresponds to a critical TS content of 29.4%±1.6 $g.g^{-1}$ (Orzua *et al.*, 2009). Biogas production was monitored throughout the fermentation process in the reactors operated at six different TS contents. In all conditions, biogas production ended after 11 days of operation.

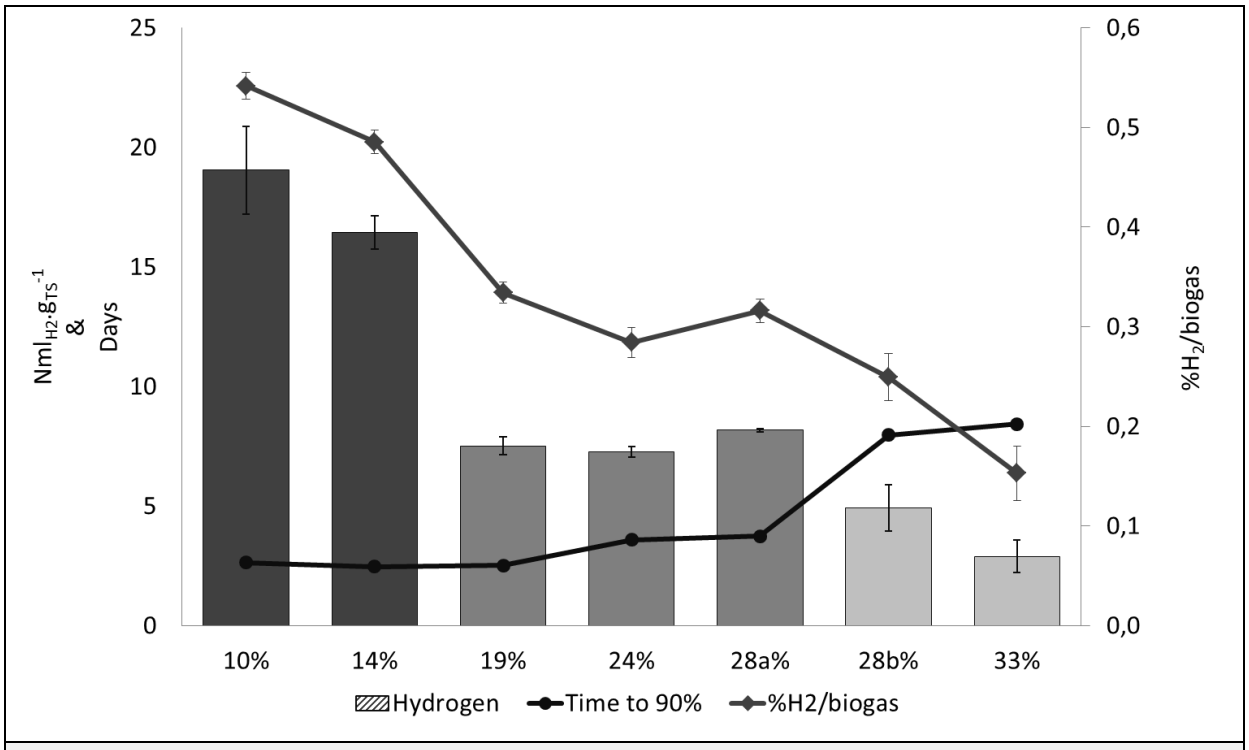


Figure 5-15: Bio-hydrogen production for the TS content tested.
Results are expressed in terms of maximal volume, percentage of hydrogen produced and time to achieve 90% of the total hydrogen production.

5.2.2.5.1.2 Biogas production

Biogas production globally decreased with the increase of TS content from more than 35 NmL.g_{TS}^{-1} for 10 and 14% TS, between 22 and 26 NmL.g_{TS}^{-1} from 19 to 28% TS and less than 20 NmL.g_{TS}^{-1} for 28 and 30% TS. Based on kinetics and biogas production, two distinct behaviors within the four replicates were observed at 28% TS: two replicates (named 28a% TS) had a similar trend to the experiments carried out at lower TS values, while two other replicates (named 28b% TS) behaved as at higher TS content. Other indicators are presented in the Figure 5-15 to differentiate the conditions: the time to achieve 90% of the total biogas production, the biogas quality (ratio H_2/biogas) and the biohydrogen yield. The time to achieve 90% of the H_2 production was affected by the TS content: it was lower than 4 days between 10 and 28a% TS (fast reaction rate), and longer than 8 days between 28b and 33% TS (slow reaction rate). Moreover, the hydrogen content of biogas was strongly impacted and significantly decreased with the increase of TS content, from about 55% of H_2 in the biogas at 10% TS to 15 at 33% TS. Hydrogen production was lowered by the increase of TS content and three groups were distinguished (p-value of 2.8e-13 ***): at 10 and 14% TS, hydrogen production was higher than 15 NmL.g_{TS}^{-1}, between 8 and 9 NmL.g_{TS}^{-1} at 19 to 28% TS, and lower than 5 NmL.g_{TS}^{-1} at 28 and 33% TS. Based on the correlation of Monlau, *et al.* (2012b), the soluble sugar analysis indicated an hydrogen potential of 21.6 NmL.g_{TS}^{-1}. The hydrogen potential of the wheat straw estimated was higher than the 17.8 NmL.g_{TS}^{-1} of hydrogen obtained at 10% TS. Even though, the hydrogen potential is higher than generally reported in the literature (between 5 and 10 NmL.g_{TS}^{-1} (Nasirian *et al.*,

2011; Quéméneur *et al.*, 2012a)), the results suggest that only the soluble phase of the substrate was degraded.

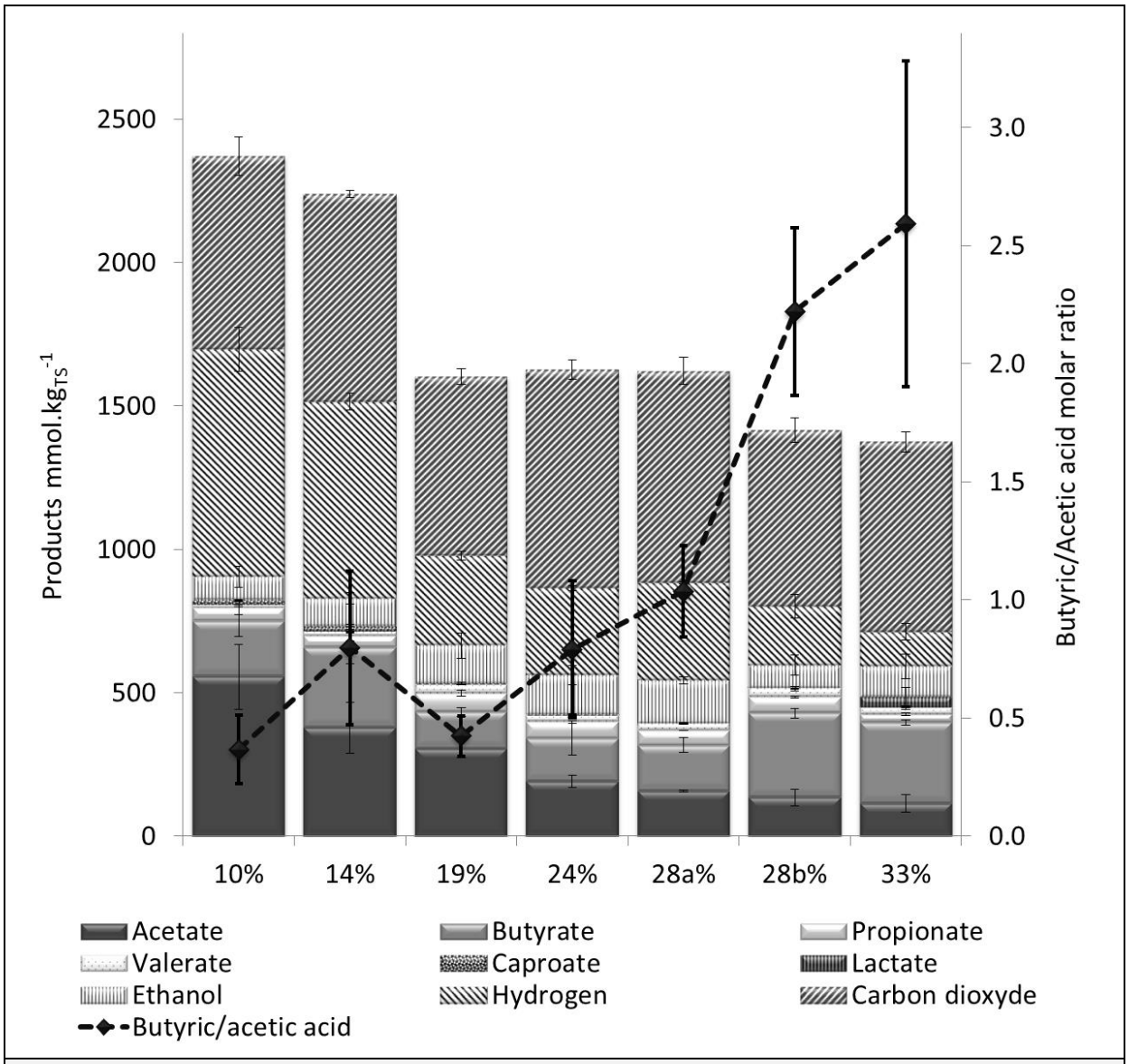


Figure 5-16: Distribution of fermentative products and butyric/acetic acid ratio for the six TS contents tested.
The sum of fermentative products indicates the straw conversion yield.

5.2.2.5.1.3 Conversion into metabolites

In addition to biogas production, soluble fermentative end-products were simultaneously produced. Total concentration of soluble metabolites increased with the increase in TS content, with 3.6±0.2, 5.4±0.3, 5.6±0.5, 6.4±1.0, 8.0±0.4, 9.8±1.2 and 11.9±1.4 g.L $^{-1}$ of soluble phase at 10, 14, 19, 24, 28a, 28b and 33% TS, respectively. The decrease of water content leads to high apparent metabolite concentrations. These concentrations are theoretically highly inhibitory for methanogenic activity, even though they are classically observed with no inhibition in dry AD (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). The overall final pH remained constant around 5.5±0.1 for all conditions despite the high

concentration of soluble products. This pH was in the range of optimal pH for dark fermentation (between 5 and 6) (Fang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2010), because of the presence of the MES buffer. Therefore, in this experiment, the absence of inhibition due to the potential acidification of the medium was likely due to the presence of a buffer. In Figure 5-16, the molar concentration of end-products (H_2, CO_2, VFA, ethanol and lactate) was normalized by the amount of total solids in the medium. The corresponding data are given as table (Tableau 5-13). The sum of all these products, after normalization, indicates the reaction advancement of the microbial conversion of wheat straw. According to the TS content, three groups were distinguished based on substrate conversion advancement (p-value of 5.7e-12 ***): 10 and 14% TS with around 2288±168 mmol.kg_{TS}^{-1} of fermentative products, 19 to 28a% TS with around 1610±41 mmol.kg_{TS}^{-1}, and finally 28b and 33% TS with around 1389±38 mmol.kg_{TS}^{-1}.

Metabolite production (mmol.kg_{TS}^{-1})	10% TS	14% TS	19% TS	24% TS	28a% TS	28b% TS	33% TS
Hydrogen	794±77	685±29	313±15	302±9	341±3	205±41	121±29
Carbon dioxyde	672±67	726±12	624±29	763±34	738±47	615±43	662±35
Acetic acid	554±113	378±90	305±32	191±22	156±3	135±29	114±29
Propionic acid	47±23	38±15	66±29	57±5	52±0	56±2	29±6
Butyric acid	194±52	280±56	127±15	152±60	161±27	294±17	281±9
Valeric acid	8±4	16±3	30±2	23±2	23±3	29±9	23±5
Caproic acid	19±3	19±9	3±4	1±3	0±0	0±0	0±0
Ethanol	83±38	99±21	133±45	138±34	151±12	79±36	108±42
Lactate	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	3±4	36±33

Tableau 5-13: Distribution of fermentative products for the six conditions tested. The 28% TS condition is a threshold value and is split in two groups.

Tableau 5-14 shows the distribution of metabolites regarding the three following categories: gas products, soluble products associated to hydrogen production (*i.e.* acetic and butyric acid), and soluble products leading to no hydrogen production (*i.e.* other VFA, ethanol and lactate). For all the conditions, proportion of gas products (H_2 and CO_2) was in the same order of magnitude, *i.e.* between 57 and 67% of the sum of metabolites. However, as revealed by the H_2/CO_2 ratio, three groups were distinguished (p-value of 2.1e-11 ***): 10 and 14% TS with a H_2/CO_2 molar ratio of 1.06±0.14, 19 to 28a% TS with 0.46±0.05 and 28b to 33% TS with 0.23±0.09. On the overall range of TS content, the hydrogen-associated VFA, *i.e.* acetic and butyric acids, represented between 20 and 32% of the sum of metabolites. However, their distribution revealed only two groups based on the butyric/acetic acid molar ratios (p-value of 2.6e-8 ***): from 10 to 28a% TS with an average value of 0.69±0.32, and 28b and 33% TS with a significantly higher ratio of 2.47±0.59. Homoacetogenic activity was quantified by estimating a theoretical molar balance between the hydrogen produced or

consumed for the production of acetic, propionic and butyric acid from glucose equivalent and the experimental amount of hydrogen (Équation 31, 32 and 35). The difference indicated the hydrogen consumed, mainly by homoacetogenesis: 462, 312, 357, 174, 81, 303 and 359 mmol.kg_{TS}^{-1} of missing hydrogen at 10, 14, 19, 24, 28a, 28b and 33% TS, respectively. If for every condition the molar balance was in agreement with the accumulation of acetic acid, at 28b and 33% TS a lack of hydrogen was observed that could not be explained by any metabolite production.

	Unit (molar %)	Wet (W) 10% ≤ TS ≤ 14%	Dry (D) 19% ≤ TS ≤ 28%	Highly dry (HD) 28% < TS ≤ 14%	Similarity W-D group	Similarity D-HD group
Gas products	**Total products**	**63±2**	**63±5**	**57±5**	**Similar (p=0.34 ns)**	**Different (p=1e-2*)**
Hydrogen	Gas products	51±3	31±3	18±6	Different (p=3e-7***)	Different (p=2e-4***)
Carbon dioxide		49±3	69±3	82±6	Different (p=3e-7***)	Different (p=2e-4***)
Hydrogen associate VFA	**Total products**	**30±3**	**23±5**	**29±2**	**Different (p=3e-2*)**	**Different (p=2e-4***)**
Acetic acid	H_2 associate VFA	62±12	62±10	29±5	Similar (p=0.12 ns)	Different (p=5e-7***)
Butyric acid		38±10	38±12	71±5	Similar (p=0.12 ns)	Different (p=5e-7***)
Other metabolites	**Total products**	**7±2**	**14±2**	**13±4**	**Different (p=3e-5***)**	**Similar (p=0.26 ns)**
Propionic acid	Concurrent metabolite	23±4	26±3	26±13	Similar (p=0.54 ns)	Similar (p=0.39 ns)
Valeric acid		7±3	12±3	14±3	Different (p=7e-4*)	Different (p=2e-2*)
Caproic acid		15±7	1±2	0±0	Different (p=2e-7***)	Similar (p=0.07 ns)
Lactic acid		0±0	0±0	12±13	Similar (p=0.27 ns)	Different (p=2e-3*)
Ethanol		55±7	60±7	52±10	Similar (p=0.71 ns)	Similar (p=0.12 ns)

Tableau 5-14: Distribution of fermentative products for the six conditions.
The 3 groups of TS content are classified in three categories: gas products, VFA associated to the production of hydrogen and other metabolites. The similarity between group wet and dry and group dry and highly dry is indicated based on the ANOVA analysis (Significant level p-value: < 0.001 "***", < 0.01 "**", < 0.05 "*" and > 0.05 "ns").

The other fermentative products (propionic, valeric and caproic acids, ethanol and lactate) are associated to no-hydrogen producing pathways and corresponded to less than 7% of the total fermentative products for 10 and 14% TS, and more than 13% from 19 to

33% TS. The products distribution within this category was similar in most of the operating conditions for ethanol (p-value of 0.17 ns) and propionic acids (p-value of 0.45 ns) corresponding to 25%±7 and 56%±8 of the other metabolites, respectively. The main differences of "no-hydrogen" metabolism were the measurement of 17% of lactate at 33% TS (p-value of 2e-3 *) and around 15% of caproic acid at 10 and 14% TS (p-value of 2e-7 ***) and a decrease of valeric acid quantity at 10 and 14% TS (p-value of 7e-4 *).

5.2.2.5.2 Distinguishment of three acidogenesis behaviors

In this study, the increase in TS contents had two consecutive consequences on acidogenesis: a sharp reduction of 25% in wheat straw conversion between 14 and 19% TS, followed by a clear shift in metabolite distribution at 28% TS. Based on these two observations, a classification in three groups of the effect of TS content on acidogenesis is proposed: a wet fermentation group (W) for 10 ≤% TS ≤ 14, a dry fermentation group (D) for 19 ≤% TS < 28a, and a highly-dry fermentation group (HD) for TS values of 28b <% TS ≤ 33.

5.2.2.5.2.1 Wet Fermentation : Group (W)

The group W, *i.e.* 10 and 14% TS batch tests, corresponds to water-saturated conditions usually described as wet digestion for AD systems. Wet digestion is characterized by a liquid medium, that allows homogeneity in the bioreactor, full access of the degrading microorganisms to the substrate, and dilution of inhibitory products (VFA) (Pommier *et al.*, 2007). Under these conditions, substrate conversion rate is mainly limited by solid hydrolysis (Frigon & Guiot, 2010). Concerning the fermentation, the group W is characterized by the highest hydrogen production (more than 15 $NmL.g_{TS}^{-1}$), a fast reaction and a hydrogen-producing pathway-oriented metabolism (more than 50% of the biogas). Fermentative end-products corresponded mainly to a biogas (around 63% of the total metabolites), acetic and butyric acids (around 30% of the total metabolites), and ethanol and propionic acids (for the last 7%). Additionally, butyric/acetic acid ratios of 0.4 and 0.8 observed respectively at 10 and 14% TS, are low when compared to the overall stoichiometric ratio of 1.5 for hydrogen production reported by Guo, *et al.* (2010). Therefore, hydrogen-consuming pathways were likely to occur either through homoacetogenesis (low butyric/acetic acid ratio, Équation 34) or propionic acid producing pathway (Équation 35) (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a). Overall, the W group shows a microbial metabolism favorable to the synthesis of microbial by-products that are easily degradable by subsequent methanogenesis (hydrogen, acetic and butyric acid) (Vavilin & Lokshina, 1996; Wang *et al.*, 1999).

5.2.2.5.2.2 Dry fermentation : Group (D)

In D group, *i.e.* batch tests operated between 19 and 28a% TS, metabolite distribution and reaction rate were both similar to the W group. The distribution of soluble fermentative products corresponded mainly to acetic and butyric acids (23% of total metabolites), with a butyric/acetic acid ratio ranging from 0.4 to 1.0. Such metabolite distribution is consistent with literature data for dark fermentation under dry conditions (Valdez-Vazquez *et al.*,

2005a). The decrease of H_2 content in the biogas and an increase of CO_2 production were also observed in group D. The homoacetogenic activity was in lower proportion than in W group experiments: 17%±4 of the total straw conversion against 8%±4. Therefore, the decrease of H_2 content can be explained by higher production of concurrent metabolites (30% more) which conducts to a direct consumption of hydrogen to generate propionic acid (Équation 35) or the production of carbon dioxide and ethanol with no hydrogen (Équation 38). Therefore, both ethanol and propionic acid can explain the decrease of the H_2/biogas ratio. Microorganisms involved in the production of ethanol and propionic acid are known to be more resistant to environmental stress than hydrogen-producing bacteria (Van Ginkel & Logan, 2005; Li *et al.*, 2012). The decrease of substrate conversion yield of 30% between W and D group (1300 down to 900 mmol.kg_{TS}^{-1} of fermentative product) was likely caused by the decrease of substrate accessibility due to the reduction of water content. Indeed, switching from wet to dry conditions make more difficult for microorganisms to access to solids (Martin, 2001). This hypothesis is also consistent with the slight changes of metabolisms observed between W and D groups, and the decrease of performances generally observed in dry digestion processes (Forster-Carneiro *et al.*, 2008). The limit between the two groups occurred between 14 and 19% TS in this study and is consistent with literature data although this limit has not been clearly defined with values varying between 15 and 20% TS (De Baere & Mattheeuws, 2010; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2012). In the present study, no clear threshold value could be determined and further studies are required by refining the TS content between 14 and 19% TS.

5.2.2.5.2.3 Highly Dry fermentation: Group (HD)

The HD group, *i.e.* 28b and 33% TS batch tests, was characterized by very low H_2 production, low H_2/biogas ratio and slow fermentation rates requiring eight days to reach the maximum hydrogen productivity. The substrate conversion was reduced by around 40% of the W group and 15% of the D group. Thus, by reducing the water content, its effect was increased in the HD group, with a slight increase in ethanol and propionic acid production. This observation could explain partly the reduction of H_2 content in the biogas (only 18%) by a higher production of CO_2. If the amount of acetic acid is similar to D group, a very high concentration of butyric acid was measured (Quéméneur *et al.*, 2012a). Since every mole of butyric acid produced is associated to the production of two moles of hydrogen (Équation 32), the quantity of hydrogen measured is lower than expected (288 mmol.kg_{TS}^{-1} of butyric acid against 163 mmol.kg_{TS}^{-1} of hydrogen). Although the existence of H_2-consuming pathways that could have redirected microbial activity (Équation 34 and 35), the low quantity of acetic and propionic acids fails to explain the occurrence of high concentration of butyric acid concomitant to a low hydrogen yield. These observations may suggest an unknown butyric pathway with no hydrogen production (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). The important decrease of water content could explain such a metabolic shift occurring under these very particular conditions.

In addition, the value of 28% TS corresponded to a critical TS content. Two duplicates (28a%) behaved like experiments in D group (19 and 24% TS) while the two others (28b%) were classified in HD group. Interestingly, similar shifts were previously reported and discussed in studies dealing with organic solids AD (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Even though the tested substrate differs (cardboard versus urban waste), these experimental works identified a threshold value of about 30% TS, beyond that AD was inhibited by high VFA accumulation. Abbassi-Guendouz, *et al.* (2013) found the emergence of specific bacterial communities for highly dry anaerobic digestion (*Clostridium sp.*) and specific *Archaea* for W, D and HD groups. To explain this phenomenon, Staley, *et al.* (2011) suggested that the role of local spatial heterogeneities is essential, as proposed elsewhere by Martin (2001). These authors assumed that the reduction in water content could create high local concentrations of inhibitory products leading to depleted zones with no microbial activity. However, such niches were not observed at a centimeter scale(Staley *et al.*, 2011). It was proposed that these depleted areas could exist but at microscopic scale (Martin, 2001). Based on experimental and modeling approaches, a similar threshold of 30% TS was observed with two distinct behaviors where semi-liquid and dry conditions (10 to 30% TS) were limited by microbial hydrolysis rates, and highly dry digestion (30 and 35% TS) was limited by liquid/gas mass transfers (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). According to drying test results, the critical TS content was estimated at 29.4±1.6% (ratio in $g_{TS}.g^{-1}$). Therefore, at higher TS contents, no free water was available for wheat straw degradation. Interestingly, the limit between dry and highly dry group (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012) is consistent with the critical TS content shown in this study with two different substrates and batch reactors operated under different conditions, eg. no pH buffering. This value may be the limit above which free water appears to be limiting in the medium. The highly dry fermentation might be affected by a lack of free water available for microbial activity with consequences in microbial metabolisms, as shown in this study. In solid-state fermentation, Orzua, *et al.* (2009) suggested that the free water content is an important parameter impacting both biological and physical mechanisms of the system (Martin, 2001; Pommier *et al.*, 2007). Since the lack of free water appeared only for TS content higher than 29%, extracellular enzymatic activity might remain active (Olofsson, Bertilsson & Lidén, 2008). Further studies are required to verify whether this critical TS content may correspond to the maximum TS content to be applied for efficient acidogenesis on organic waste.

5.2.2.6 Conclusions

The present study investigates the effect of TS content on wheat straw acidogenesis from wet to highly dry conditions (10 to 33% TS) (Figure 5-17). Compared to wet conditions, dry media faced heterogeneities responsible for a decrease of substrate conversion yield without modification of the metabolic pathways. However, a metabolism shift unfavorable for valuable biogas production was observed at 28% TS. It was supposed that this clear limit is linked to the decrease of free water in the media. This work concludes that fermentation

of lignocellulosic waste in dry conditions could be optimized in order to produce hydrogen or valuable VFA.

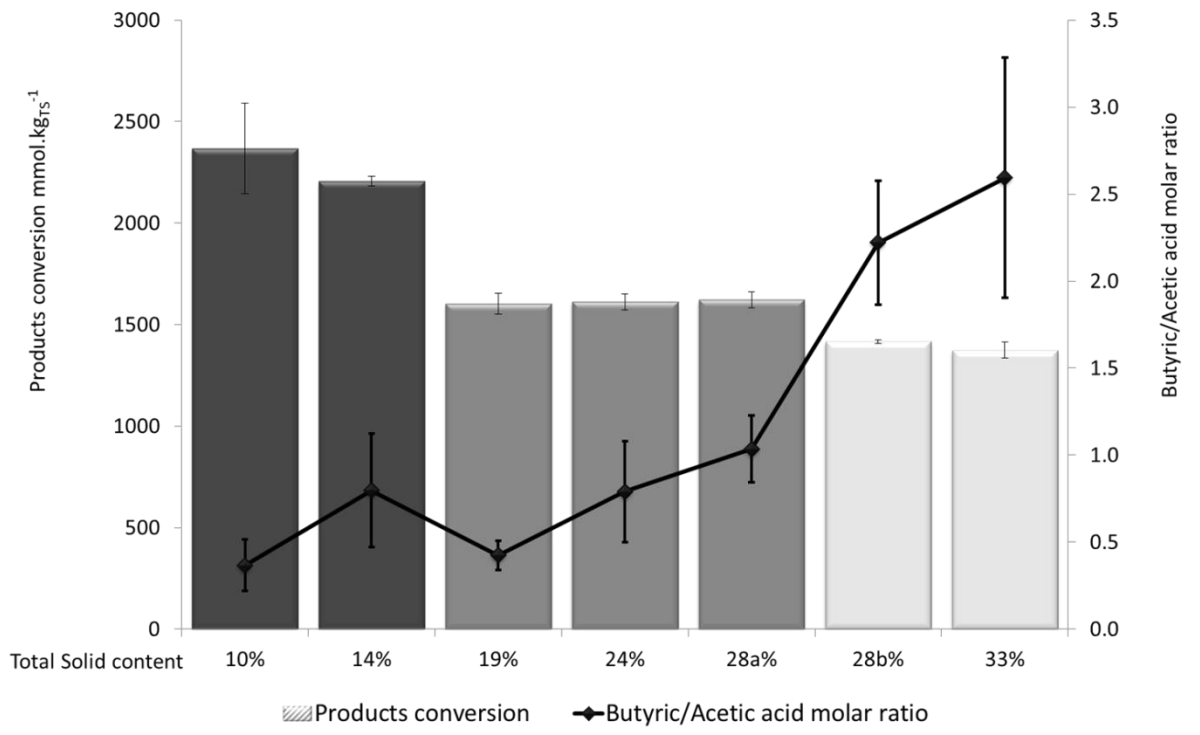


Figure 5-17: Summary illustration of the observations of the experiment.
If a reduction of substrate conversion occurred when TS content increased, a metabolic shift was only identified at 28% TS.

5.2.2.7 Methods

5.2.2.7.1 Substrate

Wheat straw (*Triticum aestivum)* was harvested in July 2010 in an organic farm located in the Herault region (France). A bale was homogenized manually, aliquoted in plastic bags and stored at ambient temperature. The straw was then milled at 1 mm and sieved between 0.4 and 1 mm. The Van Soest fractionation was performed with the fiberbag system (Gerhardt). Content in soluble sugars, structural carbohydrates and klason lignin were determined according to Monlau et al. (2012b). The proportion of free and bound water was assessed with a drying test of wheat straw, according to the protocol proposed by Garcia-Bernet, *et al.* 2011. This method identifies the moisture content when the water evaporation kinetic starts to decrease. This point, marking the transition between bound to free water, is defined as the critical water fraction w_c (water content expressed in $g.g_{TS}^{-1}$).

5.2.2.7.2 Inoculum source

Four different digestates were sampled in AD plants treating organic waste and were mixed to obtain a high microbial diversity in the initial anaerobic inoculum. Two digestates were collected from two UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) digesters treating effluents from a sugar factory or sludge from a wastewater treatment plant under mesophilic and thermophilic conditions, respectively. Two other digestates were sampled in two dry anaerobic digesters treating the organic fraction of municipal waste and operated under mesophilic and thermophilic conditions. The digestates were centrifuged at 3000 g during 15 minutes at 4°C and the liquid phase was collected as inoculum. A thermal treatment (90°C, 15 min) was applied on the inoculum to eliminate any methanogenic activity (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Quéméneur *et al.*, 2012a). It had a pH of 8.95 and was composed of 2.4% TS and 1.5% VS.

5.2.2.7.3 Acidogenesis batch tests

Batch tests were operated in four replicates, with six different TS contents ranging from wet to dry conditions: 10, 14, 19, 24, 28, and 33 $g_{TS}.g^{-1}$. In each 600mL flask, the medium was composed of: 21.4±0.1 g of straw, 69.3±1.4 mL of inoculum, 16.0±0.3 g of MES buffer (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) and 10 ml of a 3.2% NaOH solution to maintain a pH at 5.7±0.1 and 4.1±0.1 mL of a trace-element solution with the following composition: 1.5g.L^{-1} of $FeCl_2,H_2O$; 62 mg.L^{-1} of H_3BO_3,H_2O; 117 mg.L^{-1} of $MnSO_4,H_2O$; 26 mg.L^{-1} of $CoCl_2,6H_2O$; 120 mg.L^{-1} of $ZnCl_2$; 28 mg.L^{-1} of $NiCl_2,6H_2O$; 38 mg.L^{-1} of $CuCl_2,2H_2O$; 31.8 mg.L^{-1} of $NaMoO_4,2H_2O$ and 4.4 mL of HCL 37%. Distillated water addition was calculated by mass balance on both TS and VS contents (including straw, inoculum, buffer, and solution addition) in order to obtain the required TS contents: 259.2±1.9, 130.3±1.0, 67.6±0.7, 30.6±0.3, 5.1±0.1, 0.0±0.0 mL for 9.5, 14.2, 18.8, 24.0, 28.1, and 33.2% TS, respectively. The batch tests were then incubated at 35°C±1 for 11 days.

5.2.2.7.4 Biogas quantification and analysis

All batch reactors were connected to a multiplexed R3000 micro-gas-chromatograph (µGC) with two analytical capillary columns (SRA instrument) to monitor biogas production on line. The first column was dedicated to CO_2 analysis and corresponded to a MolSieve 5Å (10 m length and 0.32 mm diameter) with argon as carrier gas at a pressure of 30 psi. The second column dedicated to O_2, H_2, N_2 and CH_4 analysis was a PLOT Q (8 m length and 0.32 mm diameter) with helium as carrier gas (20 psi). The injector and column temperatures were 90°C and 80°C, respectively. The detector was a micro-catharometer (µTCD). Multiplexing the channels allowed the simultaneous connection of 28 batches tests with a measure of the biogas composition every four hours. The µGC set up allowed maintaining a constant pressure in headspace by biogas sampling when pressure was higher than 1.1 bars.

5.2.2.7.5 Analytical procedure

Reactors were sampled at the beginning (after the inoculation phase) and the end of each experiment. Samples were homogenized with magnetic mixer (10 and 14% TS series) or by hand-shaking (19 to 33% TS series). In order to extract the liquid fractions of the reactors a gravimetric dilution to 5% TS was performed. The liquid phase was then extracted after filtration with a microfiber filter GF/D (2.7 µm Whatman). The pH was measured immediately after dilution. VFA were measured with a gas chromatograph VARIAN 580 composed of an Elite-FFAP crossbond®carbowax® 15 m column connected to a FID detector at 280°C. Nitrogen at 6 $mL.min^{-1}$ was used as carrier gas. Main fermentation metabolites were analyzed after filtration at 0.2 µm by High Performance Liquid Chromatography equipped with a Biorad HPX 87H column at 35°C. The eluting solution corresponded to a 0.005 M H_2SO_4 water solution at a flow rate of 0.4 $mL.min^{-1}$.

5.2.2.7.6 Statistical analysis

The R software (version 2.15.1) coupled with Rcmdr package version 1.8-4 was used for statistical significances measurement, using variance analysis (ANOVA) with a p-value at 0.05. The notations of significant levels were: p-value < 0.001 "***", < 0.01 "**", < 0.05 "*" and > 0.05 "ns".

5.2.2.8 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the University of Montpellier 2, France, for its financial support of JC Motte's PhD.

5.2.3 TOTAL SOLID CONTENT DRIVES HYDROGEN PRODUCTION AND MICROBIAL SELECTION DURING THERMOPHILIC FERMENTATION

Jean-Charles MOTTE [a], Eric TRABLY [a]*, Jérôme HAMELIN [a], Renaud ESCUDIÉ [a], Anaïs BONNAFOUS [a], Jean-Philippe STEYER [a], Nicolas BERNET [a], Jean-Philippe DELGENES [a], Claire DUMAS [a]

[(a)] INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France

** Corresponding author: eric.trably@supagro.inra.fr*

5.2.3.1 Abstract

Applying solid-state conditions to dark fermentation of lignocellulosic residues could decrease the reactor volume and the specific energy consumption for reactor heating. To evaluate the effect of total solid content (TS) on thermophilic hydrogen production, dark fermentation of wheat straw was operated in batch at six TS contents ranging from wet to dry conditions (10 to 34% TS). Three groups of TS content were distinguished: wet conditions (10 and 14% TS) with 15.3±1.6 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$, an intermediate condition (19% TS) with 6.4±1.0 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$ and dry conditions (25 to 34% TS) with 3.4±0.8 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$. Such a decrease in biohydrogen yields was related to the emergence of a lactic acid metabolism in high solid batches. This modification was explained by a microbial population shift between wet and dry conditions: three *Clostridia* species were dominant in wet conditions, while a co-dominance of *Bacilli*, *Bacteroidetes* and two other *Clostridia* species were observed in dry conditions.

5.2.3.2 KeyWords

Biohydrogen; Dark Fermentation; Lignocellulosic residues; Solid-state processes; *Hyd*A genes; Lactic acid bacteria;

5.2.3.3 Highlights

- Higher hydrogen production in water-saturated conditions than in dry conditions.
- Different species carried out hydrogen production in wet and dry fermentation.
- Solid-state fermentation favors the growth of Bacilli and Bacteroidetes species.
- Dark fermentation shifted to lactic acid metabolism from 19% TS.

5.2.3.4 Graphical abstract

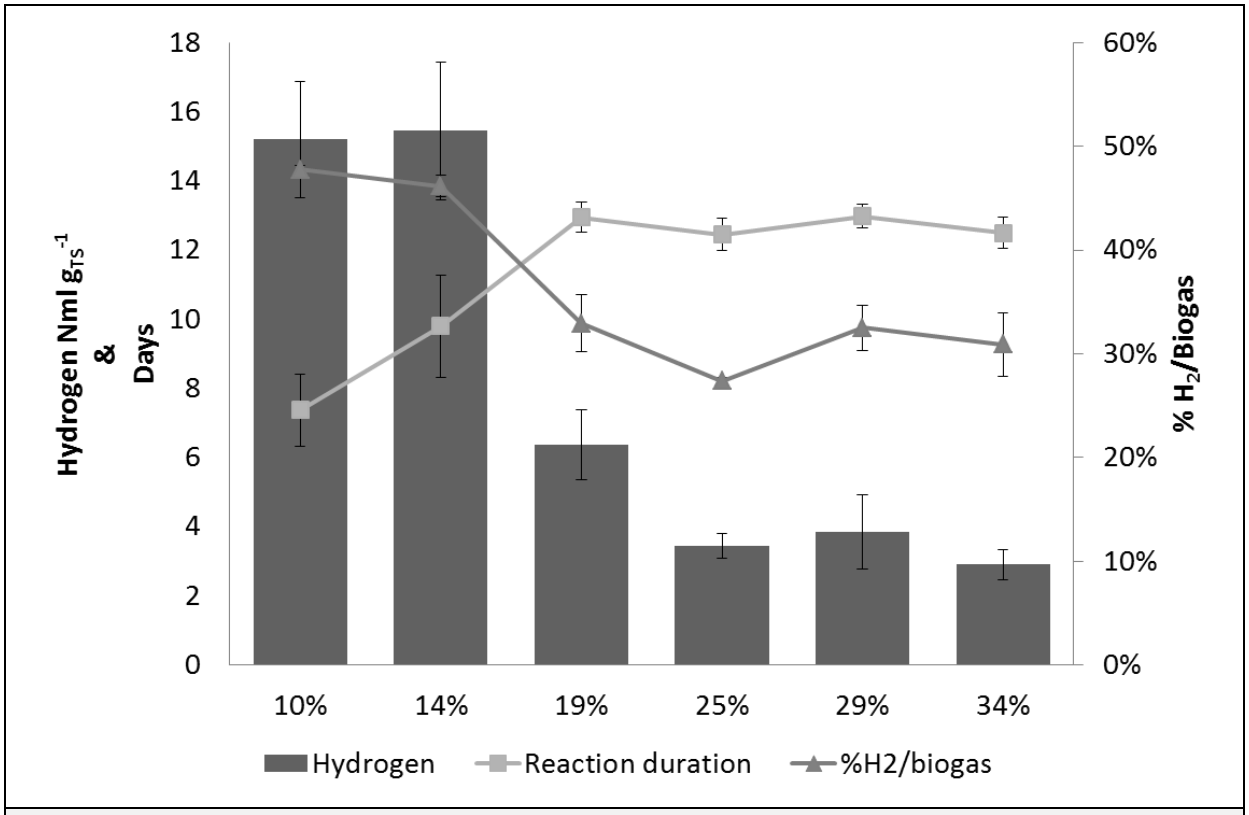


Figure 5-18 : Graphical abstract of the article untitled: "Total solid content drives hydrogen production and microbial selection during thermophilic fermentation".

5.2.3.5 Introduction

Dark fermentation of lignocellulosic residue is a topic of wide interest in which renewable energy (hydrogen, H_2) as well as valuables molecules (volatile fatty acids, organic acids or alcohols) are concomitantly produced (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a; Guo *et al.*, 2010). Recent studies have focused on the improvement of dark fermentation performances through the optimization of process conditions (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b), substrate pretreatment to increase hydrogen potential (Fan *et al.*, 2006; Quéméneur *et al.*, 2012a) and better understanding of involved fermentative communities (Quéméneur *et al.*, 2011, 2012b). The development of dark fermentation processes at industrial scale is mainly limited by economic considerations such as investment, low hydrogen yield and energy consumption (Levin, Pitt & Love, 2004). By increasing the Total Solid content (TS), digester size and specific energy consumption for heating or effluent drying can be reduced (Vandevivere *et al.*, 2002). Similarly, anaerobic digesters that produce methane can be operated under high TS content and two technologies are nowadays distinguished: wet (< 15% TS) and dry (> 20% TS) processes (De Baere & Mattheeuws, 2010; Motte *et al.*, 2013). Applying solid-state advantages to dark fermentation might favor the economical balance and develop biohydrogen production at industrial scale. Although several studies investigated dry conditions (Valdez-Vazquez *et al.*,

2005a, 2005b), only a few have been devoted to the effect of TS content on dark fermentation (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b; Robledo-Narváez *et al.*, 2013). Even if these studies concluded that increasing TS content under dry conditions reduced hydrogen production, observations were done in mesophilic fermentation using organic solid waste or agroindustrial waste as substrate, which structure and composition are different from lignocellulosic waste.

Wheat straw can be considered as a model substrate for lignocellulosic residues (Vassilev *et al.*, 2012). Potentially, biohydrogen yield in thermophilic water saturated conditions was reported around 45 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$ (Ivanova *et al.*, 2009), which is higher than the ones usually found under mesophilic conditions between 5 and 10 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$ (Nasirian *et al.*, 2011; Quéméneur *et al.*, 2012a). Regarding the conditions favorable to substrate hydrolysis (Kaparaju *et al.*, 2009), thermophilic processes provide a favorable environment for organic matter conversion to hydrogen . However, the main technical limitation of using thermophilic conditions at bigger pilot or industrial scale is the energy required for heating the reactor (Guo *et al.*, 2010). Since the reduction of water content can lead to a decrease of such specific energy consumption and reactor size (Cecchi *et al.*, 1991), dry technologies represent an interesting alternative for hydrogen production.

Dark fermentation involves many microorganisms that are capable to produce H_2 and, organic acids (Volatile Fatty Acids (VFA) and lactic acid) and alcohols (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a). Under strictly anaerobic conditions, only two main metabolic pathways, *i.e.* acetic and butyric acid pathways, can produce H_2 (Guo *et al.*, 2010). Several concurrent metabolic pathways, such as lactic, valeric, propionic acids or ethanol, lead to substrate degradation with no H_2 production. Moreover, several microbial reactions, such as homoacetogenesis or propionic acid production, can also consume hydrogen as substrate. Therefore, many reactions can be involved simultaneously in a dark fermentation process and the analysis of the final pattern of fermentative products is an efficient indicator of global microbial community behaviors. However, process parameters might affect the metabolic pattern of the microbial populations or the competition between fermentative microorganisms.

The aim of this study is to investigate the effect of TS content on metabolic pathways and microbial populations involved in thermophilic dark fermentation of wheat straw. Six TS contents ranging from wet to dry conditions (10 to 34% TS) were tested under thermophilic conditions.

5.2.3.6 Material and methods

5.2.3.6.1 Hydrogen production in dry batches reactors

Dark fermentative batch tests were carried out in four replicates, in 600 mL flask at six different TS contents: 10, 14, 19, 25, 39 and 34% TS. Wheat straw was milled at 1 mm and

then sieved between 2 grids of 0.4 and 1 mm. A mix of four digestates was used as inoculum to maximize the initial microbial diversity. The soluble fractions of two mesophilic and thermophilic solid-state anaerobic digesters treating the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) were mixed with two sludge sampled from upflow anaerobic sludge blankets (UASB) treating a sugar factory effluent (mesophilic) and wastewaters sludge (thermophilic). Since a constant S/X ratio of 20 (in VS basis) was used, 21 g of wheat straw and 64 mL of inoculum were added in each flask. MES buffer (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid) was added at a concentration of 100 mM to maintain a constant pH of 5.5. 1 mL of a trace element solution was added according to the composition of Quéméneur *et al.* (2012a). Finally, the amount of water to be added was adjusted to reach the various TS content conditions. After flushing the headspace of the reactors with nitrogen, the flasks were incubated at 55°C for 14 days.

5.2.3.6.2 Analytical procedure of fermentative products

Biogas composition was measured with a multiplexed R3000 micro-gas-chromatograph (SRA instrument), allowing simultaneous online analysis and monitoring of the 24 batches tests. Biogas production was quantified by pressure measurement every four hours. When pressure in the reactor exceeded 1.1 bar, biogas was sampled and injected (injector at 90°C) inside two analytical capillary columns heated at 80°C. A MolSieve 5Å column (10 m, 0.32 mm) with argon as carrier gas was dedicated to CO_2 measurement, while a PLOT Q column (8 m, 0.32 mm), with helium as carrier gas, was used to separate O_2, H_2, N_2 and CH_4. Gas components were then detected with a thermal micro-catharometer (µTCD).

Medium was sampled at the end of the experiment to analyze the soluble phase composition. TS content was measured by weighting the sample after 48 hours of heating at 105°C and VS content after 3 hours at 550°C. A gravimetric dilution at around 5% TS followed by a filtration at 2.7 µm of each sample (Whatman GF/D glass microfiber filters) were performed to extract the soluble phase. The pH was measured immediately after dilution. Volatile Fatty Acids (VFA) were quantified with a VARIAN 580 gas chromatograph equipped with an Elite-FFAP crossbond®carbowax® column (15 m) and a FID detector (280°C), and operated with nitrogen (6 $mL.min^{-1}$) as carrier gas. For lactate and ethanol analysis, the soluble phase was further filtered at 0.2 µm and then injected in a High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) equipped with an Aminex HPX 87H column (Biorad) at 35°C and working with a 0.005 M H_2SO_4 water solution as eluant (0.4 $mL.min^{-1}$).

5.2.3.6.3 DNA extraction and PCR amplification

500 mL of sample were sampled for each reactor at the beginning and the end of the experiment and stored at -20°C for subsequent DNA analysis. Total DNA was extracted using the protocol of Rousselon *et al.* (2004). After extraction and purification, DNA amount and purity in the extracts were assessed by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan). The V3 region of the 16S rRNA genes were amplified using universal primer pairs W49 (5'ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3', *E. coli* position 330) and W104

(5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', *E. coli* position 533). 50 µl of PCR mixture were prepared using: 1 µl of purified, 0.5 µM of each primer, 0.5 U of Pfu turbo DNA polymerase (Stratagene), 1x Pfu Turbo DNA polymerase buffer, 200 µM for each dNTP and ultrapure water. The PCR reactions were performed in a Mastercycler ep gradient S thermal cycler (Eppendorf). After a denaturation step of 2 minutes at 94°C, 25 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec a 61°C and 30 sec at 72°C) were applied for amplification followed by a stabilization step of 10 minutes at 72°C. Similar amplification were performed with the *hyd*A genes using primers hydAClosF (5'ACCGGTGGAGTTATGGAAGC-3', *C. pasteurianum* position F1258) and *hyd*AClosR (5'-CATCCACCTGGACATGCCAT-3', *C. pasteurianum* position F1508) (Quéméneur *et al.*, 2011). PCR mixture was similar to 16S genes but PCR amplification was composed of 35 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 57°C and 30 sec at 72°C). For both 16S and hydA genes, the presence and size of PCR products were determined by electrophoresis using a 2100 Bioanalyzer (Agilent).

5.2.3.6.4 CE-SSCP and pyrosequencing

One microliter of PCR products (16S and *hydA* genes) were properly diluted and mixed with 18.8 µL of formamide and 0.2 µL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were denatured during 5 minutes at 95°C and immediately cooled in ice. Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) electrophoresis was performed using an ABI prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). The separation was performed in 50 cm long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems). For 16S genes, the elution was carried out at 12 kV and 32°C for 30 min whereas 64 min were required for *hyd*A genes. CE-SSCP raw data were analyzed using GeneScan software (Applied Biosystems) and the StatFingerprint R library as described by Quémeneur *et al.* (2011).

A sample representative of the initial conditions and three samples representative of the fermentation behavior according to TS content (10, 19 and 29% TS) were selecting for microorganisms identification. Pyrosequencing of the V4-V5 regions of 16S rDNA genes was performed to identify the microbial populations (Molecular Research Laboratory, TX, USA). An average of 2800 sequences per sample was processed using a proprietary analytical pipeline (Molecular Research Laboratory, TX, USA) (Team, 2008). By clustering with 3% of divergence, taxonomical classification was performed using BLASTn against a curated GreenGenes database.

5.2.3.6.5 Statistical analysis

A statistical analysis was performed with R software (version 2.15.1; (Team, 2008)) using the Rcmdr library version 1.8.4. Variance analysis (ANOVA) indicated the statistical significance between conditions according to the following significant levels: p-value < 0.0005 "***", < 0.005 "**", < 0.05 "*" and > 0.05 "ns".

A Principal Component Analysis (PCA) of the CE-SSCP fingerprinting profiles and the correlation with the most discriminant parameters were performed using the *vegan* library of the R software. Levels of significance were similar than the ANOVA analysis (p-value < 0.0005 "***", < 0.005 "**", < 0.05 "*" and > 0.05 "ns").

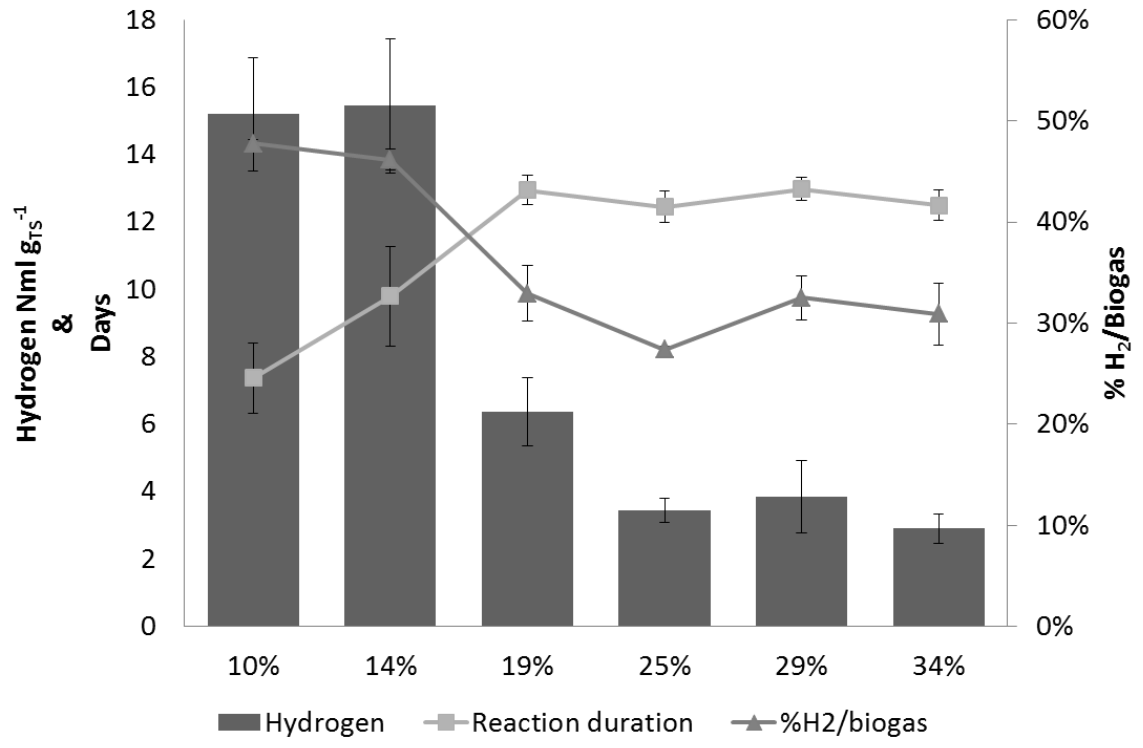


Figure 5-19: Effect of TS content on dark fermentation in terms of biohydrogen yield, reaction duration before hydrogen consumption and hydrogen proportion in the biogas.

5.2.3.7 Results and discussion

5.2.3.7.1 Impact of TS content on hydrogen yields

Figure 5-19 presents the maximal hydrogen yields according to the initial TS contents. The highest hydrogen yields were observed at 10 and 14% TS with 15.2±1.7 and 15.4±2.0 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$, respectively. These values are lower than the ones already reported in the literature in thermophilic conditions (Ivanova *et al.*, 2009), but higher than in mesophilic conditions (Nasirian *et al.*, 2011; Quéméneur *et al.*, 2012a), and can be attributed to the absence of substrate pretreatment. The increase of TS content (from 19 to 34% TS) led to a significant decrease of hydrogen production (< 8 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$). Similar hydrogen yields were indeed observed at 25, 29 and 34% TS, with 3.4±0.4, 3.9±1.1 and 2.9±0.4 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$, respectively. At 19% TS, an intermediate hydrogen yield, *i.e.* 6.4±1.0 $NmL_{H2}.g_{TS}^{-1}$, was observed, indicating a progressive effect of TS content between 15 and 20% TS. This observation is consistent with literature data for anaerobic digestion (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Motte *et al.*, 2013).

Although the hydrogen yields were lower in dry conditions, the time to reach the maximum of accumulated hydrogen was also increased (Figure 5-19). Whereas less than 10 days were required to obtain the maximal accumulated hydrogen at 10 and 14% TS, around 13 days were necessary for TS content higher than 19% TS. Under wet conditions, the duration time, *i.e*. about one week, was closer to values previously reported in similar experiments (Quéméneur *et al.*, 2012a). This longer reaction duration in dry conditions can constitute a limitation for further development of solid-state dark fermentation.

The reduction of the biohydrogen yields is a results of both a decrease of the hydrogen content in the biogas as well as a decrease of total biogas production : 45% of hydrogen in the biogas at 10 and 14% TS, and only 30% of hydrogen from 19 to 34% TS. Such a decrease of hydrogen content was in favor of carbon dioxide accumulation, and methane was not detected in the biogas. Higher CO_2 concentration can be attributed either to direct hydrogen consumption in a local environment, e.g. homoacetogenesis, that may be favored by lower gas transfer at high TS (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), or metabolic routes concurrent to hydrogen pathways such as solventogenesis or lactic acid production (Guo *et al.*, 2010).

5.2.3.7.2 Metabolic routes associated to hydrogen production

Figure 5-20 represents the molar distribution of the fermentative end-products after 14 days of fermentation for the six TS contents tested. The total substrate conversion, revealed by the total production of fermentative products, can split three distinct statistical groups (***p-value=9e-14) depending of the TS content: (i) one group where the production of fermentative products (metabolites, hydrogen and carbon dioxide) was the highest with 1935±123 mmol.kg_{TS}^{-1}, corresponding to “wet” conditions (*i.e*., at 10 and 14% TS); (ii) one group operated under “dry” conditions (*i.e*., 25 to 34% TS), where metabolite production was lower with only 931±90 mmol.kg_{TS}^{-1}; and (iii) the last group corresponding to an intermediate degree of conversion (1323±70 mmol.kg_{TS}^{-1}) at 19% TS, indicating an intermediary point between wet and dry conditions.

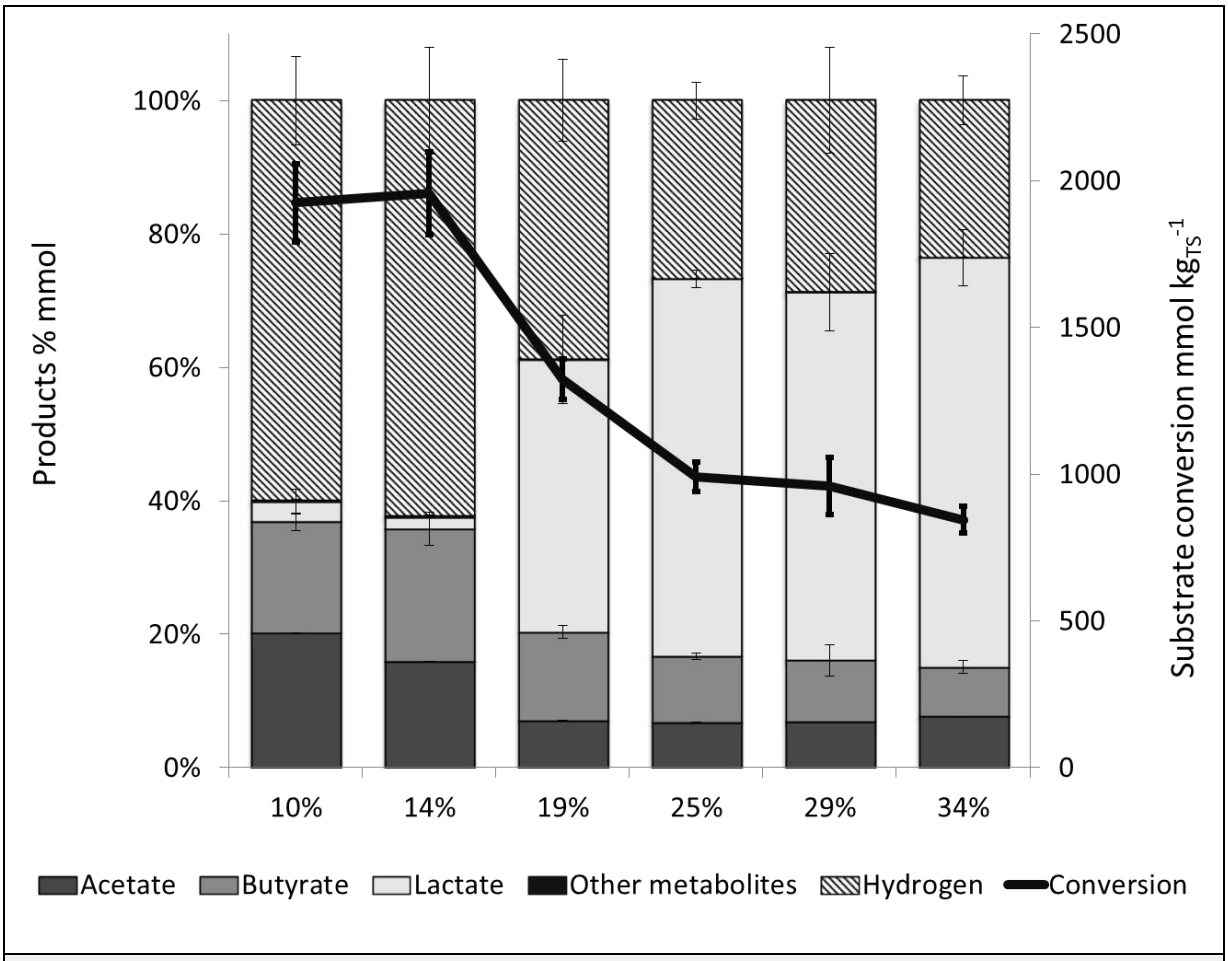


Figure 5-20: Molar distribution of fermentative products and substrate (straw) conversion for the six TS contents tested.
Other metabolites are composed of propionic, valeric, caproic acids and ethanol.

More precisely, a high production of acetic and butyric acids, *i.e*. 204±19 and 205±22 mmol.kg$_{TS}^{-1}$, respectively, was observed under wet conditions and was concomitant to high hydrogen yields, *i.e*. 685±71 mmol.kg$_{TS}^{-1}$. Such VFA distribution indicates that hydrogen was issued from both acetic and butyric acid pathways. Theoretically, these two hydrogen-producing pathways lead to the production of two moles of hydrogen per mole of acetic or butyric acid. Here, the experimental molar ratio of $H_2/C_2\&C_4$ was 1.7±0.2 at both 10 and 14% TS conditions. Since this ratio is lower than 2, this result suggested that hydrogen consumption likely occurred. In addition, the butyric/acetic acid molar ratio is often used as an indicator of a good achievement of the fermentation process in mixed culture (Guo *et al.*, 2010). Here, this ratio was 0.8±0.1 at 10% TS and 1.3±0.3 at 14% TS (molar ratio), which is consistent with Quéméneur, *et al.* (2012a) who reported values around 1.2. Both ratios are lower than the usual ratio of 1.5 (Guo *et al.*, 2010) and they therefore support the hypothesis that acetic acid was partly produced by homoacetogenesis. Interestingly, homoacetogenesis was more active at 10% than at 14% TS since the butyric/acetic acid ratio was lower (*i.e.* 0.8 against 1.3). This difference can be attributed to the time at which the metabolite analysis was performed, *i.e*. at the end of the experiment. Considering that more H_2 accumulated at 10% TS and the time to reach the maximal hydrogen yield was longer with

6.5 days at 10% versus 8.6 days at 14%, a difference of 2 days was likely sufficient to quantitatively increase homoacetogenic activity. Other fermentative products accumulated at a lower extent and were composed of ethanol, caproic and lactic acids counting for only 4%±1 of total fermentative products.

Under dry conditions, *i.e*. from 25 to 34% TS, total substrate conversion decreased down to 931±90 mmol.kg_{TS}^{-1}, which represents only 48% of the total substrate conversion observed in wet conditions. Furthermore, the fermentative end-products distribution was also different. Indeed, the metabolites linked to hydrogen-producing pathways (hydrogen, acetic and butyric acids) counted only for 26%±3 of total metabolites. The production of hydrogen, acetic and butyric acids was reduced to 152±28 mmol.kg_{TS}^{-1}, 41±4 mmol.kg_{TS}^{-1} and 51±11 mmol.kg_{TS}^{-1}, respectively. A molar ratio $H_2/C_2\&C_4$ of 1.6±0.2 mol.mol^{-1} was obtained, suggesting a consumption of hydrogen as under wet conditions (ratio <2). Butyric/acetic acid ratios were around 1.3±0.3 for dry conditions, suggesting the presence of homoacetogenesis in similar proportion than under wet conditions. The main difference with wet conditions concerned the higher production of lactate (333±23 mmol.kg_{TS}^{-1}, ***p-value=5e-15), which corresponded to approximately 36% of the fermentative products. As shown by Hofvendahl et al. (2000), the accumulation of lactic acid can be related to several parameters such as temperature, pH, reactor configuration, carbon source or the presence of lactic acid producers bacteria. In the present experiment, temperature, reactor configuration and carbon source were similar for all reactors and pH was maintained constant around 5.1±0.1 by using a proper amount of MES buffer. However, dry anaerobic environment supposes local heterogeneous conditions, where pH, inhibitors or substrate concentrations might affect locally the microbial activity (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Therefore, such an accumulation of lactic acid in dry conditions could be attributed to the effect of high TS content on the microbial consortium through heterogeneous environmental conditions. Consistently with wet conditions, other fermentative metabolites such as ethanol and caproic acid were not representative of the metabolic routes under dry conditions since they were not detected.

Interestingly, the batch tests operated at 19% TS presented an intermediary behavior between wet and dry conditions. Although the production of lactic acid was similar to the values of the dry group (302±49 mmol.kg_{TS}^{-1}, ns p-value=0.155), the hydrogen yield was significantly higher than for the dry group, (286±45 mmol.kg_{TS}^{-1}, ***p-value=3e-4) but lower than the wet group. Compared to dry conditions, the higher expression (+ 33%) of hydrogen associating metabolites (hydrogen, acetic and butyric acids) explains the increase of substrate conversion observed at 19% TS (1323±70 mmol.kg_{TS}^{-1} for 19% TS against 931±90 mmol.kg_{TS}^{-1} for dry conditions). Therefore, the 19% TS conditions differed from wet conditions by an over-expression of the lactic acid metabolism and a reduction of substrate conversion (1935±123 mmol.kg_{TS}^{-1} in wet conditions) and from dry group by the higher hydrogen metabolism.

5.2.3.7.3 Shift of microbial populations from wet to dry conditions

Figure 5-21-a represents the Principal Component Analysis (PCA) of the initial and final CE-SSCP 16S profiles of the bacterial communities analyzed at each TS content and its correlation with the time. It allows the distinction between conditions according to the biomass growth (differences with the initial conditions). In addition, a PCA was plot with final conditions only (Figure 5-21-b), since initial conditions did not present any fermentative activity, *i.e*. no fermentative products, lactic acid or hydrogen produced. This second PCA informs about the metabolite pattern of the batch tests. After 14 days of fermentation, the wet and dry groups and the intermediary point at 19% TS previously distinguished through their metabolic pattern. They were discriminated along the first PCA axis, which represented 55.6% of the genetic variability (68.4% of total variability for first and second axes) (Figure 5-21a). Profiles corresponding to wet conditions (*i.e.*, 10 and 14% TS) were the most distant profiles compared to the initial inoculum. This result suggests that a strong microbial growth occurred and conducted to a large differentiation of the microbial communities. In comparison, profiles measured in dry batch tests were much closer to the inoculum, suggesting a smaller differentiation. The intermediary point, *i.e*. 19% TS, showed a larger dispersion of the profiles that were distributed amongst the wet and dry profiles. The microbial structure for wet fermentation is correlated to total substrate conversion (***p-value < 0.001) and hydrogen yield (***p-value < 0.001), whereas the microbial structure of dry group is correlated to lactic acid production (***p-value < 0.001) (Figure 5-21-b). This proved that the shift of fermentative products between wet and dry fermentation was attribute to the growth of different populations in both wet and dry condition products. Therefore, in thermophilic conditions, the increase of TS content does not affect the microbial metabolism, but favors the lactic acid populations that are more resistant to acid environment (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). Meanwhile, the 19% TS profiles do not correlate with lactic acid or hydrogen accumulation, confirming that 19% TS in an intermediary condition between wet and dry conditions.

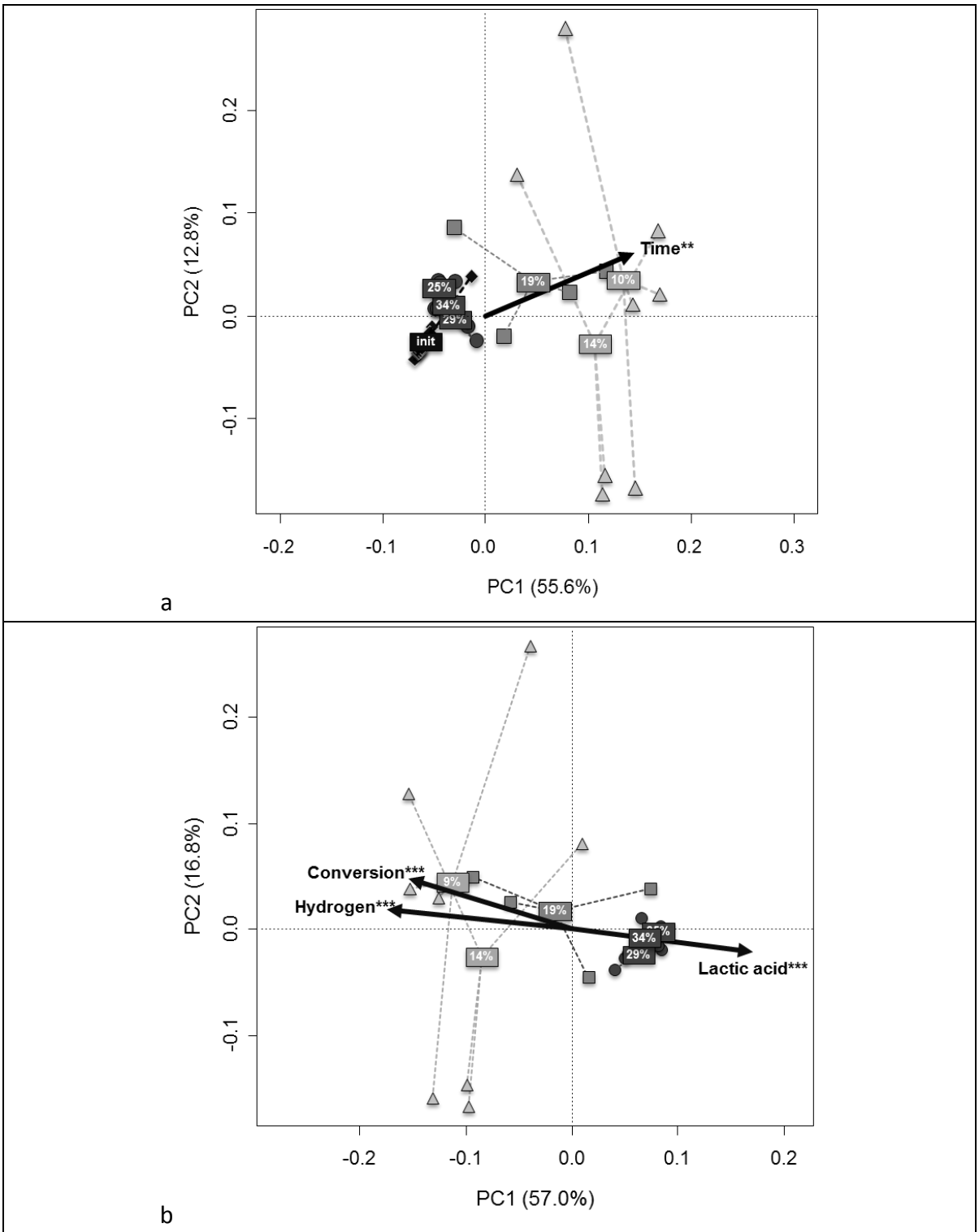


Figure 5-21: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial communities as CE-SSCP profiles.
(a) 16S rDNA distribution before (day 0) and after (day 14) fermentation classify by TS content. (b) Final 16S rDNA distribution classified by TS content.

The analysis of 16S rDNA sequences is global and non-specific regarding to the metabolic pathways involved and in particular the hydrogen production. Therefore, bacterial populations involved in hydrogen production were followed by CE-SSCP using the *hyd*A

functional gene, which encodes an essential enzyme for the H_2 production: the [Fe-Fe]-hydrogenase (Kaji *et al.*, 1999; Quéméneur *et al.*, 2011). Figure 5-22 presents the PCA of the final CE-SSCP *hyd*A profiles representing specifically the hydrogen-producing microbial population (Quéméneur *et al.*, 2011). Two groups were clearly distinguished, mainly based on the first axis that expresses 81.5% of the total genetic variations: the wet (10 and 14% TS) and dry (19 to 34% TS) groups. The *hyd*A genes reveal that the production of hydrogen at 19% TS was carried out by similar populations than for dry fermentation. Therefore, the hydrogen-producing microorganisms were impacted by TS content below 19% TS contrary to the overall bacteria populations (revealed by 16S fingerprints) which were intermediary at 19% TS. Therefore, increase of TS content between the wet and dry conditions affected first the hydrogen producing bacteria and then the rest of bacterial communities.

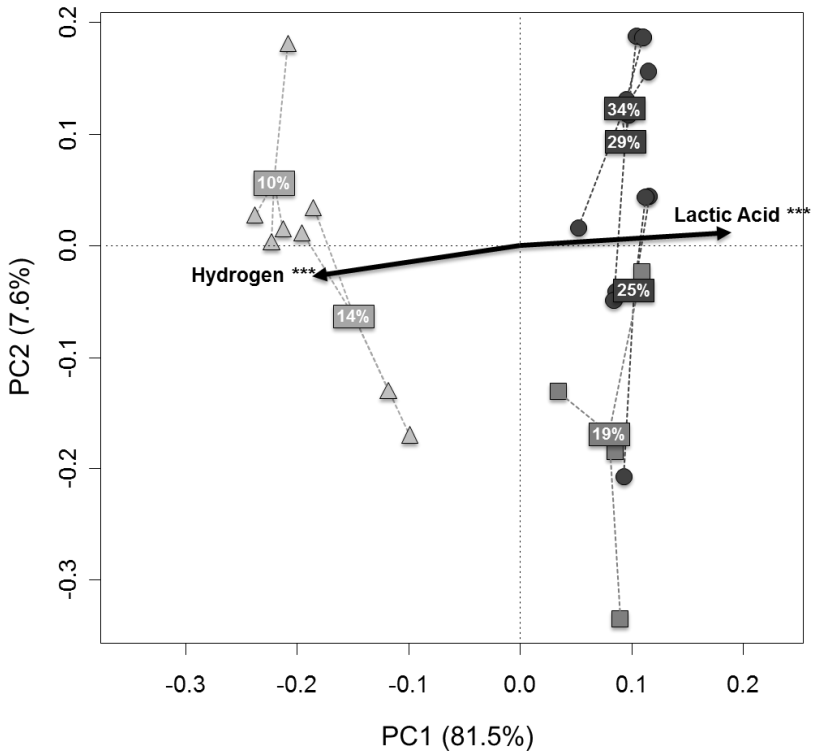


Figure 5-22: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial communities as CE-SSCP profiles based on final *hyd*A genes distribution classified by TS content.
Black arrows present the discriminant parameters with statistical significance.

The microbial adaptation was clarified by pyrosequencing results (Tableau 5-15). The inoculum was composed of a large variety of microorganisms, with more than 120 species assessed by richness estimation method described elsewhere (Chao, 1984). *Clostridia* class, *i.e*. main class of interest for hydrogen production (Guo *et al.*, 2010), represented about 31% of the total abundance in the inoculum. Despite the thermal pretreatment of the inoculum, *Archaea* represented 10.7% of this inoculum. However, because of low pH, they did not affect hydrogen production.

CLASS *Genus & Species*	10% TS	19% TS	29% TS	Pretreated inoculum
CLOSTRIDIA	**88,8%**	**59,3%**	**29,7%**	**30,6%**
Ruminococcus bromii	53,0%	43,1%	1,4%	0,1%
Coprothermobacter proteolyticus	2,6%	7,1%	12,3%	19,5%
Ethanoligenens cellulosi	15,4%	3,4%	0,0%	0,0%
Sarcina ventriculi	11,9%	0,0%	0,0%	0,0%
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	2,6%	3,2%	11,0%	0,0%
Halothermothrix orenii	0,1%	0,2%	0,3%	4,9%
Natranaerobius thermophilus	0,1%	0,4%	2,4%	0,9%
Thermaerobacter nagasakiensis	1,0%	0,0%	0,1%	0,1%
Other *Clostridium* sp. (17 species)	0,6%	0,5%	1,2%	1,3%
Other Clostridia (19 species)	1,4%	1,3%	1,1%	4,0%
BACILLI	**1,5%**	**5,1%**	**20,7%**	**5,2%**
Bacillus coagulans	0,4%	1,5%	9,9%	0,0%
Sporolactobacillus racemilacticus	0,4%	1,0%	7,7%	0,1%
Paenibacillus larvae	0,2%	1,1%	1,1%	2,5%
Aneurinibacillus thermoaerophilus	0,1%	0,1%	0,3%	0,9%
Other Bacilli (15 species)	0,4%	1,4%	1,7%	1,8%
BACTEROIDETES	**0,5%**	**2,1%**	**12,8%**	**4,5%**
Lewinella nigricans	0,3%	1,3%	7,3%	1,8%
Dysgonomonas mossii	0,0%	0,5%	2,9%	0,8%
Other Bacteroidetes (9 species)	0,2%	0,3%	2,6%	1,9%
ACTINOBACTERIA	**0,1%**	**0,3%**	**3,3%**	**3,3%**
Actinomyces lingnae	0,0%	0,0%	0,8%	1,1%
Georgenia muralis	0,0%	0,0%	0,5%	0,6%
Other Actinobacteria (18 species)	0,1%	0,2%	2,0%	1,6%
ARCHAEA	**0,2%**	**0,5%**	**2,1%**	**10,7%**
Methanobacterium beijingense	0,1%	0,3%	1,7%	7,3%
Methanothermobacter thermautotrophicus	0,1%	0,2%	0,3%	1,0%
Methanosaeta concilii	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%
Other *Archaea* (5 species)	0,0%	0,1%	0,2%	1,5%
PROTEOBACTERIA	**0,2%**	**0,5%**	**2,2%**	**4,1%**
Aeromonas simiae	0,0%	0,0%	0,2%	1,9%
Pseudomonas mendocina	0,0%	0,2%	0,5%	0,3%
Other Proteobacteria (26 species)	0,2%	0,3%	1,5%	1,9%
SYNERGISTIA	**0,7%**	**2,7%**	**1,8%**	**9,5%**
Thermanaerovibrio acidaminovorans	0,5%	2,3%	1,2%	7,4%
Anaerobaculum mobile	0,2%	0,2%	0,6%	1,4%
Other Synergistia (2 species)	0,0%	0,2%	0,0%	0,7%
OTHER BACTERIA GROUPS	**8,0%**	**29,7%**	**27,5%**	**31,9%**
OP9 (candidate division)	6,8%	26,2%	22,2%	18,9%
Thermotoga / Petrotoga mobilis	0,9%	3,0%	4,5%	9,7%
Chloroflexi / Thermobaculum terrenum	0,0%	0,2%	0,1%	1,0%
Other Bacteria (15 species)	0,2%	0,3%	0,7%	2,3%
CHAO RICHNESS ESTIMATION	153±17	136±13	120±10	125±13

Tableau 5-15: Pyrosequencing identification of the bacterial communities after 14 days of fermentation for three conditions (10, 19 and 29% TS) and in the pretreated inoculum. Classes are represented in bold characters, while species are in normal character. Only the species with relative abundance higher than 1% are presented. Light grey represents the species with abundance higher than 5%, while dark grey represents species with abundance higher than 20%. Richness estimation is calculated according to the CHAO index (Chao, 1984).

Under wet conditions, the highest difference was observed through PCA analysis (Figure 5-21b) and for richness estimation (Tableau 5-15). In particular, wet fermentation presented a strong enrichment of *Clostridia* class (from 22% of the inoculum populations to 88% of the populations after fermentation). Among them, three species were substantially enriched since they were poorly abundant in the inoculum (< 0.1%): *Ruminococcus bromii* (53%), *Ethanoligenes cellulosi* (15%) and *Sarcina ventriculi* (12%). The composition of the microbial enriched cultures of the wet group is rather common in dark fermentation processes, since *Clostridia* class is known to be dominant in hydrogen-producing systems (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009a).

In the dry group, a larger variability of microbial species was observed. The *Clostridia* class represented only 28.4% of the community with the emergence of only one species, which was not detected in the initial population: *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (11%). This microorganism is known to grow in thermophilic conditions and to produce lactic acid or hydrogen (Desai, Guerinot & Lynd, 2004; Joe Shaw *et al.*, 2008). Another species identified in dry conditions, *i.e*. *Coprothermobacter proteolyticus*, is known for its ability to produce hydrogen (Ollivier *et al.*, 1985) and to grow in dry conditions since it was isolated from a dry anaerobic digester (Kersters *et al.*, 1994). These two hydrogen-producing microorganisms were more adapted to the specific environmental conditions provided by dry media, such as high VFA content, than the three main hydrogen-producing microorganisms observed in wet condition (*Ruminococcus bromii*, *Ethanoligenes cellulosi* and *Sarcina ventriculi*). Bacteria from other classes, such as *Bacilli* (19.4%) and *Bacteroidetes* (12.3%), grew preferentially under these dry conditions. The growth of *Bacteroidetes* genus in dry conditions is consistent with their natural environments, such as soil, sediment and intestine (Thomas *et al.*, 2011), which are characterized by low water content. For similar reason, *Bacillus coagulans* was studied in solid-state fermentation (Heck *et al.*, 2005), where its strong resistance to environmental conditions (large range of pH and temperature) as well as its ability to produce lactic acid (Payot, Chemaly & Fick, 1999) were described. Finally, since *Bacilli* class is known to produce lactic acid in dark fermentation environment (Guo *et al.*, 2010), S*porolactobacillus racemilacticus, Bacillus coagulans* could be involved in the production of lactic acid observed in dry conditions.

At 19%, an intermediate composition of the microbial population was observed. Indeed, the *Clostridia* class represented 58.2% of the total community. As for wet conditions, a high abundance of *Ruminococcus bromii* (43.1%) was observed concomitantly with the

emergence of *Coprothermobacter proteolyticus* (7.1%), which was abundant in dry conditions. Interestingly, both *Bacilli* and *Bacteroidetes* were maintained at low abundance (3.7 and 2.0%, respectively), confirming that the emergence of these classes is only favored under dry conditions. Such shifts of populations were previously observed between 15 and 20% TS in mesophilic AD on *Archaea* populations (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Therefore, the limit between wet and dry conditions provides an environment that can easily conduct to a competitive advantage for more resistant microorganisms.

5.2.3.8 Conclusions

This work investigated the impact of TS content on thermophilic dark fermentation of wheat straw. It was shown that hydrogen production significantly decreased at high solid contents (from 25 to 34% TS) compared to wet conditions (10 and 14% TS). The reduction of hydrogen yield was related to lactic acid accumulation. While wet conditions favored hydrogen-producing species, such as *Clostridia* class, a larger variety of thermophilic lactic acid bacteria adapted to dry environments and producing no hydrogen were identified under dry conditions. Furthermore, an intermediary point at 19% TS was characterized by an intermediary microbial community able to produce both lactic acid, as for the dry group, and hydrogen with similar microorganisms than for the wet group, and it constituted the limit of operation of thermophilic fermentation bioprocesses.

5.2.3.9 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the University of Montpellier 2, France, for its financial support of JC Motte's PhD.

5.2.4 DISCUSSIONS DU CHAPITRE 5.2

L'objectif principal de ces expériences est de montrer le comportement des micro-organismes acidogènes vis-à-vis de la teneur en matières sèches du milieu. Deux types d'écosystèmes fermentaires ont été étudiés : les écosystèmes mésophiles et thermophiles. En condition mésophile, deux effets progressifs de la siccité sur la fermentation ont été mis en évidence. Tout d'abord, une chute des performances de fermentation est observée entre la voie sèche et la voie humide (entre 14 et 19% MS) sans impacts sur la distribution en métabolites. Ensuite, une valeur seuil a été identifiée à 28% MS au-delà de laquelle un shift métabolique producteur d'acide butyrique. Ainsi, l'analyse des résultats distinguent trois groupes au cours de la fermentation mésophile : la voie humide pour les conditions à 10 et 14% MS, la voie sèche pour les conditions de 19 à 28% MS, et la voie très sèche pour 28 et 33% MS. En condition thermophile, la teneur en matières sèches différencie deux groupes répartis autour de la limite entre voie sèche et voie humide. Ils sont différenciés principalement par un shift de population microbienne réduisant les rendements en hydrogène du procédé. La condition à 19% MS est une condition intermédiaire entre ces deux profils.

5.2.4.1 Performance de l'acidogenèse

5.2.4.1.1 Condition mésophile

Un résumé des performances de fermentation en condition mésophile est présenté dans le Tableau 5-16. En voie humide (10 et 14% MS), la production d'hydrogène (> 16 NmL.g_{MS}^{-1}) est plus importante que la littérature (≈ 8 à 9 NmL.g_{MS}^{-1}) (Quéméneur *et al.*, 2012a) ou que la manipulation sur l'impact de la morphologie (≈ 10 NmL.g_{MS}^{-1}) (chapitre 5.1.2). Cette différence peut notamment être attribuée à la composition de l'inoculum (De Gioannis *et al.*, 2013). Globalement, les vitesses de réactions sont plutôt rapides (≈ 4 jours) et les voies métaboliques exprimées conduisent à la production d'acides acétique et butyrique concomitante à la production d'hydrogène (ratio C_4/C_2 ≈ 0,6). Les conditions sèches, observées pour les teneurs en MS de 19, 24 et 28%, sont principalement caractérisées par une chute importante du rendement de conversion d'environ 30% (de 2288±168 mmol.kg_{MS}^{-1} en voie humide à 1610±41 mmol.kg_{MS}^{-1} en voie sèche). Cette diminution n'est pas associée à un ralentissement important de la cinétique de réaction (< 5 jours dans les deux conditions) ou à un changement de métabolisme (production d'acide acétique et butyrique dans un ratio molaire d'environ 0,7). Par conséquent, le fonctionnement de la réaction biologique et le métabolisme exprimé sont comparables à la voie humide. Au-delà de 28% MS, correspondant aux conditions très sèches, la diminution de rendement de conversion du substrat est très faible par rapport à la voie sèche (1389±38 mmol.kg_{MS}^{-1} à 1610±41 mmol.kg_{MS}^{-1}, ≈ 15% de diminution). Par contre, la durée de la réaction et le profil métabolique sont fortement impactés pour ces fortes teneurs en matières sèches. La réaction dure près de 10 jours pour les conditions supérieures à 28% MS

et le métabolisme conduit à une forte production d'acide butyrique (ratio $C_4/C_2 \approx 2,5$). Ainsi, les hautes teneurs en matières sèches conduisent à un shift métabolique défavorable à la production d'hydrogène. Enfin, pour toutes les conditions observées, une part non négligeable (7 à 15%) du métabolisme conduit à la production de métabolites concurrents à la production ou directement consommateurs d'hydrogène : éthanol et acide propionique, valérique, caproïque et lactique (synthèse bibliographique).

Fermentations	Humide 10 et 14%	Sèche 19 à 28%a	Très sèche 28%b à 33%
Hydrogène ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	16,5±1,8	7,0±0,4	3,3±1,2
Conversion du substrat ($mmol.kg_{MS}^{-1}$)	2288±168	1610±41	1389±38
Ratio molaire C_4/C_2	0,6±0,3	0,7±0,3	2,5±0,6
Durée (j)	3,7±0,7	5,5±1,3	9,7±0,7

Tableau 5-16 : Comparaison des performances des fermentations en condition mésophile.

5.2.4.1.2 Condition thermophile

Le Tableau 5-17 résume les performances de fermentation en condition thermophile. La voie humide, correspondant aux conditions de 10 et 14% MS, est le siège d'un métabolisme producteur d'hydrogène (15,3±1,6 $NmL.g_{MS}^{-1}$) sur une durée de réaction d'environ 8 jours. Cette production est concomitante à la production d'acides butyrique et acétique, distribués dans un ratio molaire proche de 1 (1,0±0,3). Ces indicateurs révèlent un métabolisme de production d'hydrogène classique pour de la fermentation thermophile de résidus agricoles (Guo *et al.*, 2010). Cependant, le manque de données sur la fermentation thermophile de la paille de blé ne permet pas de comparer ces résultats avec la littérature. En voie sèche, correspondant aux conditions allant de 25 à 34%, la production d'hydrogène est très faible (3,4±0,8 $NmL.g_{MS}^{-1}$). Cette baisse de rendement est à la fois liée à une baisse de conversion du substrat de près de 50% (1935 $mmol.kg_{MS}^{-1}$ en voie humide à 931 $mmol.kg_{MS}^{-1}$ en voie sèche) et à la production d'acide lactique (333±23 $mmol.kg_{MS}^{-1}$) concurrente de la production d'hydrogène. La durée de la réaction biologique est également, plus longue qu'en voie humide (environ 13 jours). La condition de 19% MS est un point intermédiaire entre la voie humide et la voie sèche par rapport à la conversion du substrat (1323±70 $mmol.kg_{MS}^{-1}$) et la production d'hydrogène (6,4±1,0 $NmL.g_{MS}^{-1}$). Par contre, la quantité d'acide lactique produite est très similaire à la voie sèche (≈ 300 $mmol.kg_{MS}^{-1}$). Enfin, que ce soit en voie sèche ou en voie humide, la fermentation thermophile conduit à une faible diversité dans la production de métabolites, puisque les acides propionique, valérique, caproïque et l'éthanol représentent moins de 1% du métabolisme.

Fermentation	Humide 10 et 14%	Intermédiaire 19%	Sèche 25 à 34%
Hydrogène ($NmL.g_{MS}^{-1}$)	15,3±1,6	6,4±1,0	3,4±0,8
Conversion du substrat ($mmol.kg_{MS}^{-1}$)	1935±123	1323±70	931±90
Ratio molaire acides Butyrique/Acétique	1,0±0,3	1,9±0,2	1,3±0,3
Acide lactique ($mmol.kg_{MS}^{-1}$)	30±18	302±49	333±23
Durée (j)	8,2±1,6	12,9±0,4	12,7±0,5

Tableau 5-17 : Comparaison des performances des fermentations en condition thermophile.

5.2.4.1.3 Acidogenèse et siccité

La production d'hydrogène en voie humide révèle des potentiels proches en fermentation mésophile et thermophile (16,5 $NmL.g_{MS}^{-1}$ à 35°C pour 15,3 $NmL.g_{MS}^{-1}$ à 55°C). Contrairement aux observations de la littérature (Shin *et al.*, 2004), aucun effet notable de la température sur la production d'hydrogène n'a été constaté. Par contre, la durée de la fermentation semble fortement allongée en condition thermophile passant d'environ de 4 jours à 35°C à 8 jours à 55°C. Le rallongement de la durée de fermentation peut néanmoins être attribué à une phase d'adaptation de l'inoculum accrue en condition thermophile (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006).

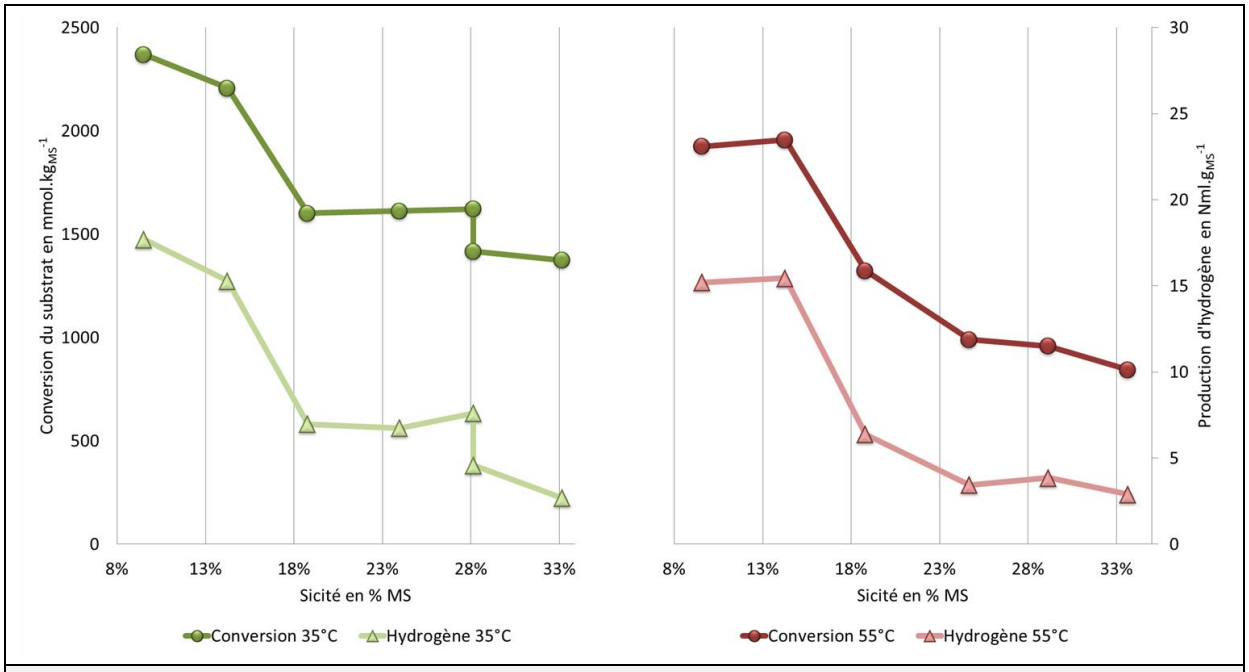


Figure 5-23 : Effet de la température sur la conversion du substrat et la production d'hydrogène en fonction de la teneur en matières sèches.

Quelle que soit la température de fonctionnement, la voie sèche est caractérisée par une diminution des performances de production d'hydrogène et de la transformation du substrat (Figure 5-23), par rapport à la voie humide. Une telle diminution des performances a été observée pour la fermentation de déchets agroalimentaires (Robledo-Narváez *et al.*, 2013) et pour un mélange de papier et de déchets alimentaires (Valdez-Vazquez & Poggi-

Varaldo, 2009b). Les conditions utilisées en voie humide sont proches du protocole utilisé pour la détermination du potentiel hydrogène de la paille. Ainsi, la voie humide correspond à des conditions où tout le substrat fermentescible est accessible aux micro-organismes. Par conséquent, la chute du rendement de conversion est attribuable à une réduction d'accessibilité au substrat, conséquence de la diminution de la phase liquide dans les milieux secs (Staley *et al.*, 2011).

La température semble avoir un impact important sur le profil métabolique du milieu réactionnel et sur les seuils de transition entre les voies humide, sèche et très sèche. Ainsi, en condition mésophile, un métabolisme producteur d'acide butyrique est exprimé pour des teneurs en matières sèches très élevées (à partir de 28% MS), tandis qu'en condition thermophile, un métabolisme producteur d'acide lactique s'exprime dès la transition entre voie sèche et voie humide (vers 19% MS). La littérature sur la fermentation en voie sèche ne fait pas état d'un changement de métabolisme en fonction de la siccité (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b; Robledo-Narváez *et al.*, 2013). Cependant, une forte corrélation entre la production d'acide butyrique et l'alcalinité du milieu a été observée (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b), suggérant que le pH du milieu peut avoir un fort effet.

Le métabolisme conduisant à la production d'acide acétique et butyrique concomitante à la production d'hydrogène semble favorable pour la digestion anaérobie. En effet, ces produits associés à l'hydrogène sont facilement assimilables lors de l'acétogenèse et la méthanogenèse (Aguilar *et al.*, 1995; Vavilin *et al.*, 1996), contrairement à l'acide propionique (Li *et al.*, 2012) ou l'acide lactique par exemple (Zhang *et al.*, 2007a). Ainsi, les systèmes producteurs d'acide acétique, butyrique et d'hydrogène présentent moins de risques d'acidification et doivent donc être favorisés en digestion anaérobie. Or, la fermentation conduit à la production d'acide butyrique au-delà de 28% MS en condition mésophile et d'acide lactique sur toute la gamme de la voie sèche en condition thermophile. Par conséquent, seul le métabolisme exprimé en voie humide et en voie sèche mésophile semble favorable pour une transformation rapide des produits de fermentation au cours de la méthanisation.

5.2.4.2 Métabolismes et communautés microbiennes

5.2.4.2.1 Condition mésophile

En condition mésophile, deux zones critiques de teneurs en matières sèches ont été mises en évidence : la limite entre 14 et 19% MS et la valeur seuil de 28% MS. Pour comprendre si ces seuils sont associés à une différenciation des communautés microbiennes ou à un changement de métabolisme d'une même communauté, des analyses microbiologiques complémentaires ont été réalisées. En particulier, l'analyse des empreintes moléculaires basée sur le gène 16S est présentée sous la forme d'une analyse en composantes principales (Figure 5-24). Aucune corrélation particulière ne semble émerger de cette analyse. Ceci indique que les communautés microbiennes ne sont pas influencées

par la teneur en matières sèches. Par conséquent, le passage en voie sèche de 14 à 19% ne conduit pas à une sélection ou adaptation des communautés microbiennes. De même, le shift métabolique observé à 28% n'est pas attribuable à une sélection des communautés microbiennes. Par conséquent, la forte production d'acide butyrique observée au-delà de 28% MS est liée à l'expression d'un métabolisme différent au sein de mêmes communautés microbiennes.

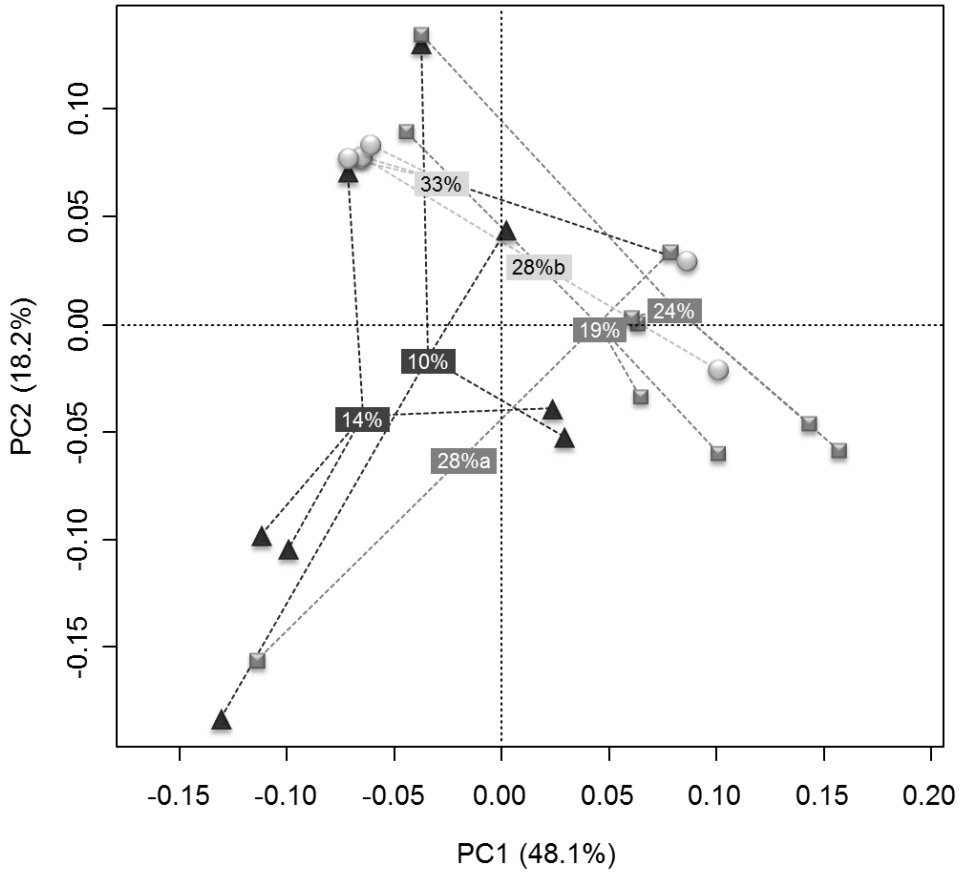


Figure 5-24 : Analyse en composantes principales des empreintes moléculaires basées sur le gène 16S.

5.2.4.2.2 Condition thermophile

La transition entre voie humide et voie sèche est plus progressive en voie thermophile et est fortement corrélée à un changement de micro-organismes. Cette modification se caractérise par une communauté microbienne productrice d'hydrogène pour la voie humide, tandis qu'en voie sèche, une communauté productrice d'acide lactique est retrouvée. Ce changement traduit donc une compétition importante entre les différents micro-organismes. Ainsi, les conditions humides ont fortement divergées vis-à-vis des conditions initiales, notamment par l'émergence d'espèces appartenant à la classe des *Clostridia* (*Ruminococcus bromii, Ethanoligenens cellulosi* et *Sarcina ventriculi*) favorables à la production d'hydrogène (Joe Shaw *et al.*, 2008). En voie sèche, la compétition microbienne tourne en faveur d'espèces adaptées à de faibles teneurs en eau (Kersters *et al.*, 1994; Heck

et al., 2005; Thomas *et al.*, 2011) telles que des membres de la classe des *Clostridia* (*Coprothermobacter proteolyticus* et *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*), de la classe des *Bacilli* (*Bacillus coagulans* et *Sporolactobacillus racemilacticus*) ou des Bacteroidetes (*Lewinella nigricans*). La condition à 19% MS présente une communauté intermédiaire entre les voies humide et sèche. Ainsi, si sa composition en espèces productrices d'hydrogène est proche des conditions sèches, la faible présence d'espèce du genre *Bacilli* ou *Bacteroidetes* la rapproche de la voie humide.

5.2.4.2.3 Limite entre voie sèche et voie humide

Les études spécifiques sur l'effet de la teneur en MS n'ont jamais mis en évidence de frontière nette entre la voie humide et la voie sèche que ce soit en méthanisation (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012) ou en fermentation (Robledo-Narváez *et al.*, 2013) (Figure 5-25). La baisse progressive de performances généralement observée entre voie sèche et voie humide peut s'expliquer par la diminution de la phase liquide limitant l'accessibilité du substrat et augmentant les hétérogénéités macroscopiques du milieu (Pommier *et al.*, 2007). Cette frontière semble donc d'avantage liée à des problématiques d'ingénierie (gestion de la phase liquide et rhéologie) (Vandevivere *et al.*, 2002). En condition mésophile, il a néanmoins été noté qu'une sélection des *Archaea* méthanogènes survient entre les voies sèche et humide (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013) contrairement aux populations bactériennes. Ces populations sont donc plus résistantes, notamment aux variations de pH, et ne semblent pas être affectées par le fonctionnement à faible teneur en eau. Ainsi, la transition entre voie humide et voie sèche peut conduire à une sélection des micro-organismes, mais il n'est pas fait état d'un changement dans leur fonctionnement face aux réductions des teneurs en eau.

En voie mésophile, cette expérience montre que les voies métaboliques exprimées en conditions sèches (jusqu'à 28% MS) sont similaires à celles exprimées en conditions humides (Figure 5-25). Ceci suggère que l'environnement immédiat des micro-organismes est peu modifier par le passage en voie sèche. En condition thermophile, une forte compétition microbienne a été constatée entre la voie humide (10 et 14% MS) et la voie sèche (25 à 34% MS). Cette compétition est progressivement affectée par la siccité comme en témoigne la condition à 19% MS qui est intermédiaire vis-à-vis de sa population microbienne, de la conversion du substrat et de la production d'hydrogène. En outre, tous les micro-organismes ne semblent pas sélectionnés de la même manière par la teneur en matières sèches : micro-organismes producteurs d'hydrogène impactés très tôt par la siccité contrairement au reste de la biomasse bactérienne (section 5.2.3), ou les *Archaea* (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Par conséquent, la transition entre voie sèche et voie humide semble être progressive du point de vue de la compétition microbienne.

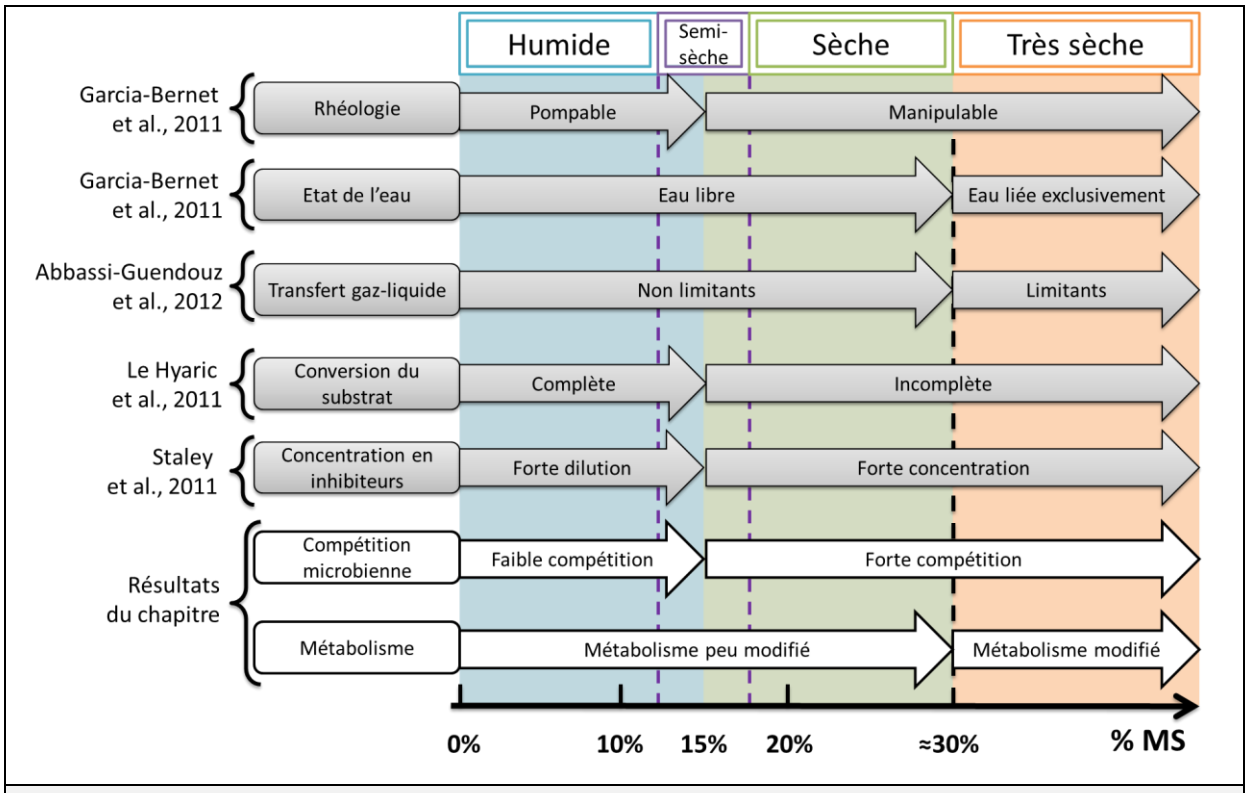


Figure 5-25 : Effet de la teneur en matières sèches sur la digestion anaérobie.
Le passage en voie sèche modifie l'équilibre entre les populations microbiennes mais pas le fonctionnement individuel des micro-organismes, tant que la présence d'eau libre est maintenue.
(Garcia-Bernet *et al.*, 2011a, 2011b; Le Hyaric *et al.*, 2011; Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012)

5.2.4.2.4 Limite entre voie sèche et très sèche

La limite entre voie sèche et très sèche (28% MS dans cette étude) est très proche du seuil observé dans la littérature sur la digestion anaérobie (Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Dans ces deux études, une chute de performance très prononcée est observée vers 30% MS sur du carton ou sur la fraction organique d'ordures ménagères (Figure 5-25). Dans les deux cas, une forte concentration en AGV et une chute de pH sont observées. Ce phénomène est notamment attribué aux mécanismes de transfert de matières entre la phase liquide et la phase gazeuse qui sont réduits pour de telles teneurs en matières sèches (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Malgré la forte différence entre les systèmes et les substrats, le seuil de littérature (30% MS) et celui de cette étude (28% MS) sont très proches. Ils caractérisent une valeur au-delà de laquelle le système n'est plus apte à produire efficacement du biogaz (hydrogène ou méthane). Dans le cadre de la fermentation de la paille, cette limite est très proche de la limite entre eau libre et eau liée (Pommier *et al.*, 2007) mesurée durant cette thèse à 29,4%±1,6 MS. Cette observation suggère que la teneur en eau libre pourrait être un facteur prédictif de la limite maximale de siccité applicable en digestion sèche.

La limite de 30% MS est notamment associée à un shift de communauté méthanogènes (*Archaea*) et bactériennes (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). Ainsi, l'émergence de *Clostridium thermobutyricum*, espèce thermophile productrice d'acide butyrique (Zhang *et al.*, 2009), a été observée pour des valeurs supérieures à 30% MS. Ici, le shift observé à 28% MS en condition mésophile est attribué à un shift de métabolisme, puisque la composition des communautés microbiennes n'est pas impactée par la teneur en matières sèches. Du point de vue réactionnel, la forte production d'acide butyrique observée pour les conditions très sèches peut s'expliquer par une consommation de l'acide acétique et du glucose pour former de l'acide butyrique (Michel-Savin *et al.*, 1990). Cette voie semble s'exprimer dans le cas de fortes concentrations en acides (Zhang *et al.*, 2009). De tels environnements apparaissent facilement en voie sèche en raison des fortes concentrations apparentes en AGV (Staley *et al.*, 2011). Ainsi, le shift métabolique semble être une réponse à la forte acidité du milieu et est donc liée à la concentration en inhibiteurs. En fermentation thermophile, ce shift n'a pas été observé en raison du shift de communautés microbiennes survenu auparavant (19% MS). Ce shift semble donc caractéristique des micro-organismes producteurs de méthane et d'hydrogène, principalement recherchés en digestion anaérobie.

5.2.5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5.2

Ce chapitre a donc permis de mettre en évidence certains phénomènes liés à l'impact de la teneur en matières sèches sur la fermentation, étape révélée comme essentielle pour le bon fonctionnement de la digestion anaérobie (Tableau 5-18). Tout d'abord, ces deux études ont confirmé la possibilité de produire de l'hydrogène en voie sèche. Au vu des résultats, il semble plus adapté de produire ce vecteur énergétique en voie mésophile, en raison d'une plus faible compétition microbienne et de rendements légèrement plus importants. Dans tous les cas, une optimisation de l'agitation et de la phase liquide sont requises pour augmenter l'accessibilité du substrat et sa conversion. La faisabilité de fermenter un substrat en voie sèche ouvre également l'opportunité de développer des procédés à deux étapes incluant une préfermentation à faible teneur en eau.

Qualitativement, la fermentation est fortement impactée par la température d'incubation. En effet, les rendements de conversion en produits de fermentation sont similaires, mais le profil métabolique qui en résulte est fortement dépendant de la température et de la teneur en matières sèches. Ces deux paramètres semblent aptes à piloter la fermentation. Cette interaction entre température et siccité est notamment mise en évidence à 19% MS. De plus, le fonctionnement des micro-organismes est dépendant des fortes concentrations en acides organiques et de la quantité d'eau libre. Ces phénomènes induisent un shift de métabolisme ou à l'émergence de communauté bactériennes caractéristiques des conditions fortement acides. En conclusion, pour les gammes classiques de la digestion sèche (< 30% MS), la teneur en matières sèches est apte à modifier l'équilibre entre les populations microbiennes mais pas le fonctionnement individuel des micro-organismes.

	Acidogenèse mésophile	Acidogenèse thermophile
Message principal	Pas d'impacts de la voie sèche sur le métabolisme microbien jusqu'à la limite eau libre/eau liée.	Forte compétition microbienne en voie sèche.
Nouveautés	✓ Fonctionnement identique des micro-organismes en voie sèche tant qu'il reste de l'eau libre. ✓ Limite microbiologique aux hautes teneurs en MS.	✓ Forte compétition microbienne en voie sèche. ✓ Micro-organismes producteurs d'hydrogène fortement impactés par le passage en conditions sèches.
Confirmation de la littérature	✓ Chute progressive des performances en voie sèche. (Le Hyaric *et al.*, 2011) ✓ Production d'hydrogène possible en voie sèche. (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b)	✓ Réduction progressive du taux de conversion du substrat en voie sèche. (Robledo-Narváez *et al.*, 2013) ✓ Capacité de la teneur en MS à sélectionner les micro-organismes. (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013)
Hypothèses et perspectives	1) Limite eau libre/eau liée comme facteur prédictif d'un changement de métabolisme défavorable à la digestion anaérobie. 2) Procédé à deux étapes avec préfermentations en voie sèche. 3) Amélioration de l'accessibilité du substrat par une meilleure gestion de la phase soluble et de l'agitation. 4) Pilotage de la fermentation par ajustement de la teneur en MS.	

Tableau 5-18 : Synthèse des résultats du chapitre 5.2.

5.3 STRATÉGIE MICROBIENNE DE BIODÉGRADATION DE LA LIGNOCELLULOSE

Ce chapitre vise à améliorer la compréhension de la biodégradation d'un substrat lignocellulosique par un écosystème de digestion anaérobie en condition de faible teneur en eau. Pour parvenir à cet objectif, la dynamique de dégradation de la paille de blé a été suivie dans deux méthaniseurs faiblement inoculés, grâce à des prélèvements d'échantillons au cours de la réaction biologique. Le procédé a tout d'abord été évalué sous l'angle de la biodégradation des cellules et des tissus végétaux pour expliquer le mode d'action des micro-organismes. Ensuite, la structuration microbienne est abordée avec l'analyse de la compartimentation spatiale des micro-organismes, réalisée grâce à un protocole spécifiquement développé durant cette thèse. Les principaux résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article devant être soumis dans le journal « Energy & Environmental Science » et d'un sous-chapitre en français dont les résultats feront l'objet d'un article.

5.3.1 AVANT-PROPOS DU CHAPITRE 5.3

Le chapitre précédent (5.2) a mis en évidence le rôle prépondérant de la teneur en matières sèches sur l'activité métabolique des micro-organismes fermentaires. Cette activité est principalement liée à la fermentation des sucres solubles du substrat (Monlau *et al.*, 2012b), et explique l'établissement de la réaction biologique. Cependant, la dégradation de la fraction solide du substrat n'a pas encore été abordée dans cette thèse, alors même qu'elle représente près de 90% de la paille. La paille est un substrat complexe à de multiples échelles dont les parties dégradables sont peu accessibles initialement (synthèse bibliographique). Les micro-organismes doivent donc développer des stratégies potentiellement complexes (Martin, 2001) pour accéder aux fractions dégradables du substrat (Kristensen *et al.*, 2008; Modenbach & Nokes, 2013), et faire face aux inhibitions induites par les produits de la dégradation (Barakat *et al.*, 2012; Jönsson *et al.*, 2013). Par conséquent, l'accessibilité et la nature du substrat à l'échelle de la biomasse microbienne constituent le moteur de la réaction. Les hétérogénéités macroscopiques de la paille de blé impactent le potentiel méthane (section 5.1.2), principalement par des hétérogénéités locales (microscopiques) qui agissent sur le fonctionnement des micro-organismes. Ainsi, la relation entre la dégradation du substrat lignocellulosique et la spatialisation des communautés microbiennes est encore inconnue.

La dégradation des tissus des plantes (histologie) et des parois végétales (cytologie) n'est que rarement abordée en digestion anaérobie. Ce manque de connaissances fines est dû à une vision globale et biochimique de ces substrats (Yang *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012; Monlau *et al.*, 2013). Pourtant, la dimension microscopique est souvent prise en compte lors de la dégradation des résidus lignocellulosique dans des environnements tels que le sol (Bertrand *et al.*, 2006; Machinet *et al.*, 2009a), le compost (Dresboll & Thorupkristensen, 2005; Dresbøll & Magid, 2006; Watteau & Villemin, 2011) ou le rumen (Engels & Schuurmans, 1992; Wilson & Mertens, 1995). Ces observations conduisent parfois à des enseignements concrets pour la conduite de ces écosystèmes (taille de particules optimales, maîtrise des hétérogénéités, ajustement des conditions opératoires). La compréhension des processus de dégradation de la lignocellulose par des observations microscopiques est le plus souvent réalisée à partir de substrats modèles (cellulose pure), bien loin de la complexité des résidus agricoles (Ahn *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005). Pourtant, l'intérêt majeur des approches microscopiques réside dans les informations apportées sur les hétérogénéités locales auxquelles font face les micro-organismes, notamment en voie sèche où ces phénomènes sont au cœur de la réaction biologique (Martin, 2001). Il est donc possible de raisonner en terme d'accessibilité du substrat à l'échelle de la cellule pour comprendre les principaux phénomènes limitant l'activité microbienne. Ainsi, l'identification des limitations locales pourrait permettre de définir la meilleure stratégie pour faciliter l'activité microbienne et donc proposer des pistes pour une optimisation à plus grande échelle.

Il a été montré dans le chapitre 5.2 que l'activité métabolique des micro-organismes est identique en voie sèche et en voie humide, mais qu'une forte compétition microbienne peut conduire à des changements de profils des communautés (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013) pouvant avoir des conséquences sur les performances du procédés. En effet, les conditions de faibles teneurs en eau augmentent les contraintes environnementales locales : concentration en inhibiteurs (Staley *et al.*, 2011), limitations locales en substrat (Pommier *et al.*, 2007) et limitation des transferts de matière (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012). Il est donc important de pouvoir identifier le positionnement des micro-organismes vis-à-vis du substrat pour mieux appréhender les contraintes environnementales locales. Pourtant, la localisation sur le substrat des différentes populations microbiennes de la digestion anaérobie n'est pas référencée (Martin, 2001). Cette information est fondamentale dans la compréhension du fonctionnement de la digestion sèche et doit inclure la notion de dynamique réactionnelle puisque les propriétés du substrat évoluent au cours de la réaction (Yang *et al.*, 2009).

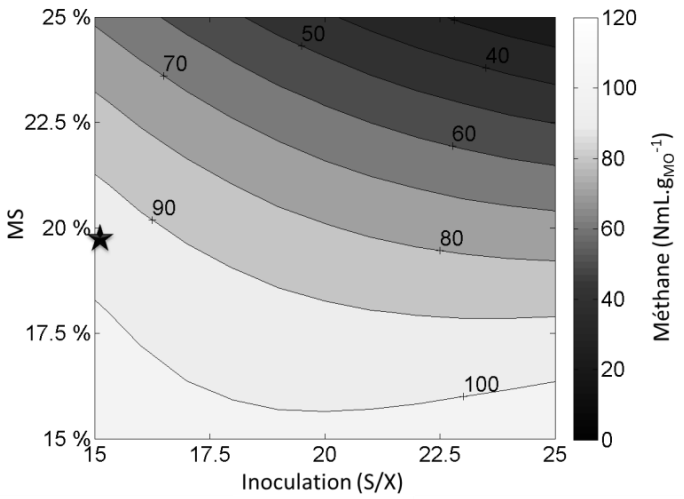


Figure 5-26 : Choix des conditions expérimentales en fonction des résultats du plan d'expérience. (section 5.1.3)

Une expérimentation spécifique a été mise en œuvre pour répondre à ces questionnements. Ainsi, deux digesteurs de type voie sèche, discontinus et faiblement inoculés, ont été conduits pendant 244 jours. Pour s'assurer du démarrage des digesteurs malgré les faibles taux d'inoculation, les conditions expérimentales ont été fixées à partir d'une surface de réponse obtenue à partir de la réponse du plan d'expérience du chapitre 5.1.3 (Figure 5-26) : S/X de 28 en MV, teneur en MS de 19,5% et une granulométrie moyenne. Au cours de la réaction, six échantillons ont été prélevés en utilisant un dispositif expérimental permettant de minimiser les perturbations du réacteur (voir Annexe). Les performances ont été évaluées par le suivi de la production de biogaz, la structure de la lignocellulose, la production de métabolites et la structure des communautés microbiennes. Deux outils originaux ont été employés pour évaluer la dégradation du tissu lignocellulosique : la microscopie électronique à transmission (MET) pour le suivi de la dégradation des cellules végétales (section 5.3.2) et un protocole de compartimentation de la biomasse microbienne pour étudier la répartition spatiale des micro-organismes sur le support (section 5.3.3).

5.3.2 DYNAMIC OBSERVATION OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUE DEGRADATION UNDER SOLID-STATE ANAEROBIC CONDITION

J-C. MOTTE[1], F. WATTEAU[2,3], R. ESCUDIÉ[1], J-P. STEYER[1], N. BERNET[1], J-P. DELGENES[1], C. DUMAS[1]*

[1] *INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France*

[2] *Université de Lorraine, LSE, UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54505, France*

[3] *CNRS, UMS 3562, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54501, France*

** Corresponding author: claire.dumas@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 76*

5.3.2.1 Abstract

Solid-state anaerobic digestion (SS-AD) of agricultural waste was developed at industrial scale with only partial knowledge on the fundamental behavior of the anaerobic ecosystem toward specific environmental conditions compared to conventional anaerobic digestion operated at lower solid content. In particular, even if degradation of the lignocellulosic fraction is ensured by microorganisms, their development on the substrate surfaces and their way of attack are unknown. For this purpose, anaerobic digestion batch tests of wheat straw were performed in dry conditions during 273 days, under a low inoculation level. Six samples were taken according to the reaction progress: initial, adaptation, growth and stabilization phases. These reactors showed an efficient process, with a methane production of 204±16 $NmL.g_{TS}^{-1}$ close to the biomethane potential. The degradations of cellulose (52%±1) and hemicelluloses (55%±2) were observed according to the reaction progress. Ultrastructural observation, using transmission electronic microscopy (TEM), indicated that microorganisms degraded the plant substrate, from the central tissues (parenchyma) to the outer (epidermis) according to the cell accessibility and the lignification degree. Under substrate limitation, a strong degradation of sclerenchyma secondary walls was identified. These observations suggested that AD microbial consortium was able to breakdown lignified walls in order to reach the poorly accessible substrates. At the end of the reaction, medium lamella and silicified walls of epidermis remained as skeleton of the degraded cell wall. The study demonstrated that the bio accessibility of a lignocellulosic substrate is the main SS-AD limiting step, which is limited by waxy layer (cuticle), tertiary cell walls and high silica content. Therefore, new pretreatments strategies are proposed to improve the accessibility to hardly degradable tissues of plants.

5.3.2.2 Keywords

Dry anaerobic digestion; Transmission electronic microscopy; Lignocellulosic residue.

5.3.2.3 Highlights

- Efficient straw degradation was followed during dry anaerobic degradation.
- Straw degradation starts from the inner tissue because of higher accessibility.
- Lignified cell walls are degraded in long term AD.
- Substrate accessibility is the main limitation factor of SS-AD degradation.

5.3.2.4 Graphical abstract

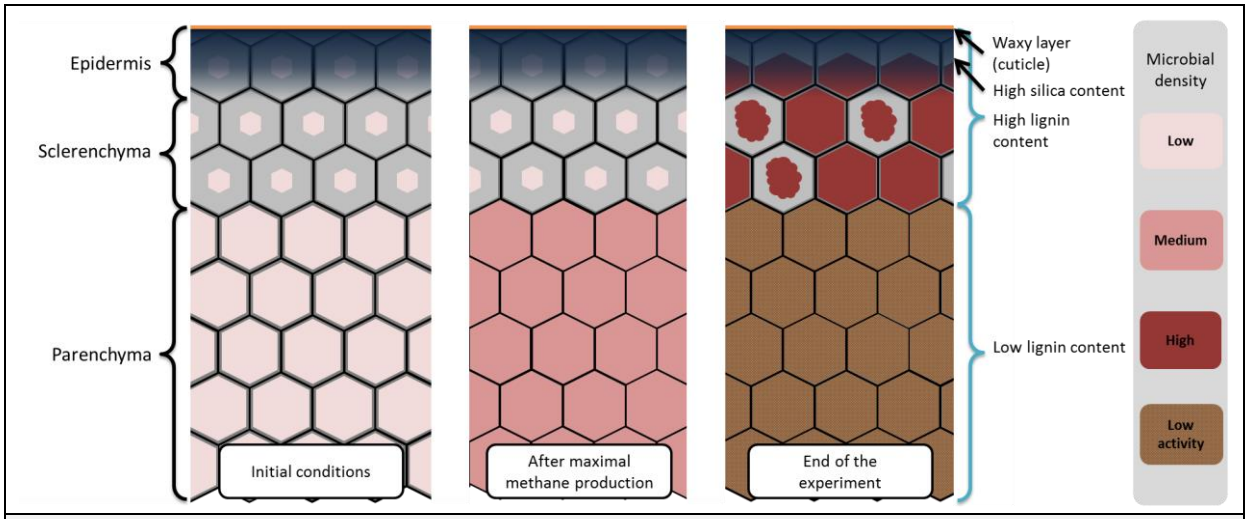


Figure 5-27 : Graphical abstract of the article untitled: “Dynamic observation of a lignocellulosic residue degradation under solid-state anaerobic condition”.

5.3.2.5 Introduction

Anaerobic digestion (AD) of agricultural residues is a process of interest for a simultaneous production of biogas (methane) and digestate with agronomical qualities (Monlau *et al.*, 2013). Unlike wet conditions, processes operating under high solids content provide economical interests such as the reduction of digester volumes, lower energy consumption for heating the reactor and simplification of digestate drying step (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). These advantages conducted to the development of solid-state anaerobic digestion (SS-AD) at industrial scale, mainly based on empirical knowledge adapted from water-saturated conditions. Therefore, a lack of optimization strategies specific to SS-AD led to difficulties in monitoring the industrial plants and to lower process performances than the one observed in wet conditions. The effects on dry anaerobic digestion of the main process parameters were investigated in recent studies: water content (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), inoculation (Cui *et al.*, 2011), pH (Staley *et al.*, 2011), rheology (Garcia-Bernet *et al.*, 2011a), temperature (Shi *et al.*, 2013) and interaction of parameters (Motte *et al.*, 2013). It was demonstrated that these parameters have a strong influence on the microbial population (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013). Therefore, the establishment of an efficient interaction between microorganisms and substrate by an optimization of process parameters or pretreatments could be a lever to

increase process performances. However, because of technical limitations, the substrate/microorganisms interactions have never been investigated under dry conditions.

Because of their high carbohydrates content (cellulose and hemicelluloses), the lignocellulosic agricultural residues are widely investigated for the production of biomolecules such as biofuels and biogas (Frigon & Guiot, 2010; Monlau *et al.*, 2013). To study the degradation of lignocellulosic biomasses, wheat straw is often used as model, since its composition is intermediary compared to many substrates (Vassilev *et al.*, 2012). Straws utilization for biotechnologies is limited by the low accessibility of the sugars contained within the matrix, which can be related to the complexity of the lignocellulosic structure and the presence of a hardly degradable polymers such as lignin (Monlau *et al.*, 2013).

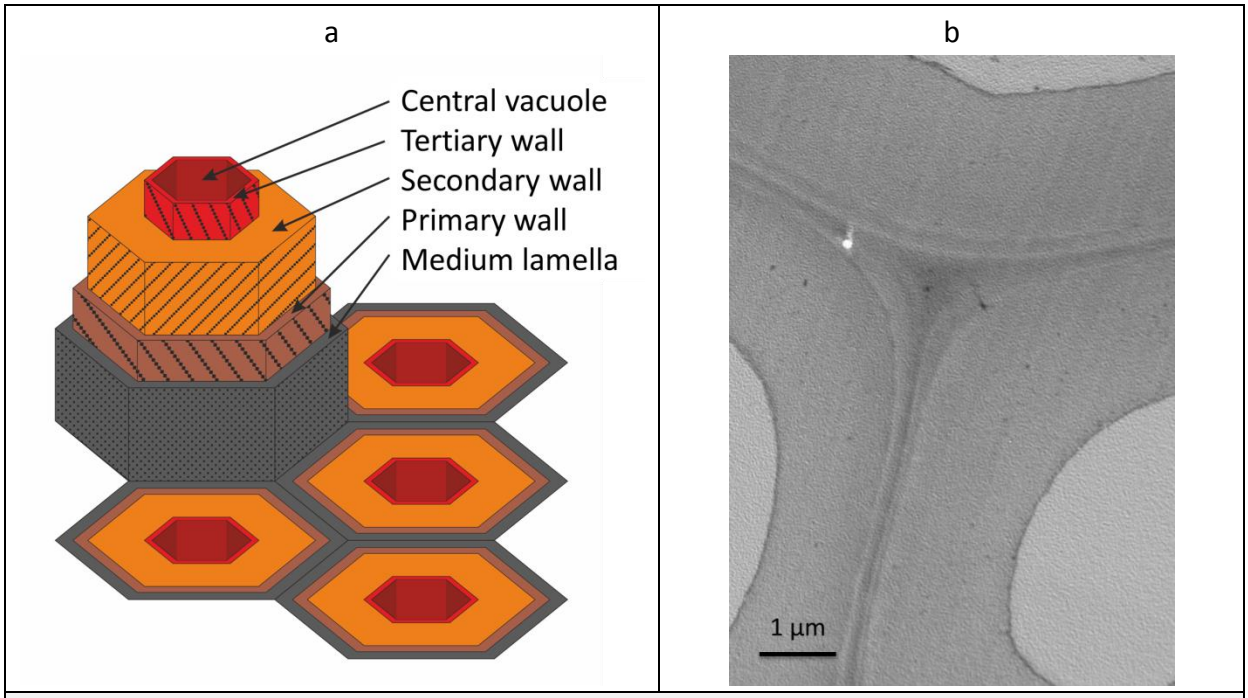


Figure 5-28 : Theoretical cell wall arrangement and corresponding observation in Transmission electronic microscopy.
(a) Model of cell wall ordination (Nougarède *et al.*, 1969). (b) Transmission electronic microscopic observation of wall arrangement of wheat straw cell (sclerenchyma).

The main components of the plant cell walls, cellulose, hemicelluloses and lignin, form a highly complex structure, which depends on the plant organs, tissues or cell walls. Wheat straws are mainly composed of stem structures (internodes and nodes) and leaves (Harper & Lynch, 1981). Despite highly different roles in the plants, these two structures present a similar tissue arrangement from the inner to the outer of the plant: parenchyma (with inclusion of a lignified vascular tissue), sclerenchyma and finally epidermal tissue (Bertrand *et al.*, 2006). Then, each cell of these tissues is composed of a succession of cell walls distributed from the outer of the cell to the center (vacuole): the medium lamella, the primary wall, the secondary wall and the tertiary wall (Figure 5-28-a) (Reece *et al.*, 2011).

The medium lamella is a fine layer of hemicelluloses and pectins linking two adjacent cells. The primary wall, associated to the growth of the cell, is flexible, fine and composed of cellulose, hemicelluloses and pectins (Kuhad *et al.*, 1997). Lignin can be included in medium lamella and primary walls mainly in case of rigidified tissue. This stiffening appeared when cell growth is achieved by the formation of a thick layer composed of cellulose and lignin : the secondary wall (Kuhad *et al.*, 1997). This growth goes from the primary wall toward the center of the cell and conduct to the reduction of the central vacuole. Finally the tertiary wall, sometimes considered as a part of secondary wall, is a very fine wall composed of residues of cellular organites and mainly composed of xylose but no cellulose (Nougarède *et al.*, 1969; Rose, 2003). The parenchyma cells are poorly lignified, contain a large vacuole and secondary walls are nearly absent. The outer tissues, *i.e.* sclerenchyma and epidermis, require mechanical resistances that are ensured by the high lignin content and thick secondary wall (Sun, 2010). In addition, epidermal tissues require waterproof action, ensured by a waxy layer (cuticle) and its mechanical resistance is improved by high silica content (Reece *et al.*, 2011).

The behavior of microorganisms during the degradation of a substrate having structural heterogeneities can be investigated by microscopic tools, such as Transmission Electronic Microscopy (TEM) (Figure 5-28-b). However, these microscopic approaches are rarely applied to identify complex substrate degradations under anaerobic digestion. Therefore, AD studies are mainly performed on model substrates such as paper or cellulose balls (Ahn *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005), which are far from the complexity of lignocellulosic residues and result to a lack of knowledge concerning the microbial degradation of complex substrate under SS-AD conditions. However, studies in other environments, such as compost (Dresboll & Thorupkristensen, 2005; Dresbøll & Magid, 2006; Watteau & Villemin, 2011), soil (Bertrand *et al.*, 2006; Machinet *et al.*, 2009b) or rumen (Engels & Schuurmans, 1992; Wilson & Mertens, 1995) were performed to investigate the microbial degradation of lignocellulosic residues. These studies demonstrated that microorganisms attack the substrate from inner tissue of the plant (Akin & Burdick, 1975). The microbial degradation of each cell starts from the vacuole toward the medium lamella (Wilson & Mertens, 1995). Therefore, for optimal plant degradation, microorganisms need to enter in the center of each cell, by a progression from cell to cell thanks to wall punctuation (plasmodesmata). The outer of the lignocellulosic residue, the epidermis, is generally not degraded, probably because of the wax layer and the silica content that limit the microbial attachment. In addition, the kinetics and efficiency of cell wall degradation seem correlated to the lignin content, since tissue containing high lignin content are poorly degraded (Bertrand *et al.*, 2006). However, aerobic ecosystems are known for their ability to degrade lignified cell, such as cell wall of sclerenchyma (Dresbøll & Magid, 2006).

These observations cannot be extrapolated to dry anaerobic digestion since both microorganisms and environmental conditions are very different (pH and moisture content). Therefore, the aim of this study is to observe and understand the microbial development

and attack on a lignocellulosic residue under SS-AD. Since the degradation of the lignocellulose is strongly impacted by reaction dynamics (Motte *et al.*, 2013), an experiment was set-up in order to follow the SS-AD dynamics in term of process performances and microscopic observations.

5.3.2.6 Material and methods

5.3.2.6.1 Experimental device in dry conditions

In this study, wheat straw (*Triticum aestivum*) was used as a model of lignocellulosic residue. This substrate was harvested in summer 2010 in an organic farm located in southern France (Hérault). After homogenization, the straw was milled at 1 mm with a cutting miller and sieved between two grids of 0.4 and 1 mm. The final average particle size was evaluated at 0.67 mm by mechanical sieving. The protocol of Monlau *et al.* (2012b) was performed to evaluate the biomethane potential of the straw. A mesophilic digestate of a digesters-AD treating the organic fraction of municipal solid waste was used as inoculum. Only the soluble fraction of this digestate, extracted by centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C), was used to inoculate the straw.

Specific reactors were designed to allow sampling during the fermentation process without any headspace perturbation. The experiment was carried out in duplicate with two glass reactors of 2.5 L containing 400 g of medium. The substrate to inoculum ratio (S/X) and the initial total solid (TS) content were fixed at 28 (based on volatile solids, VS) and 19.5%, respectively. Bicarbonate buffer (2.6 $g.kg^{-1}$) was added to avoid acidification and the initial pH was set at around 8.5. The medium was complemented with a trace element solution (Motte *et al.*, 2013) and NH_4Cl to adjust the initial C/N ratio at 40 to avoid a lack of nitrogen in the medium (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). The medium was introduced in the reactor and the headspace was flushed with nitrogen in order to maintain anaerobic conditions in the flasks before sealing. One control, using glucose as substrate, was performed to check the inoculum activity. Even if endogenous respiration could be negligible in such high S/X ratio, two controls were carried out without substrate.

5.3.2.6.2 Biogas quantification and analysis

A digital manometer LEO 2 (Keller) with a resolution of 1 mbar was used to evaluate periodically the biogas production. The biogas composition was determined by a gas chromatograph (Perkin Elmer Clarus®580). After injection of 200 µL of gas sample, a capillary column R-Q-bond (30 m length for 0.32 mm of internal diameter) separated CO_2 from other biogas. Then, H_2, O_2, N_2 and CH_4 were separated on a capillary column Rt-Molsieve 5Å (30 m length for 0.32 mm of internal diameter). The sample was transferred from the injector (250°C) to a thermal conductivity detector (150°C) with argon as carrier gas (350 kPa at 34 $mL.min^{-1}$). Biogas production was estimated by subtracting of the endogenous respiration and taking into account the loss of mass during the different sampling steps.

5.3.2.6.3 Analytical methods

Based on the biogas production, six sampling were performed to follow the reaction progress. The date were selected based on previous experiments(Motte *et al.*, 2013). These points corresponded to the startup (day 0), the adaptation phase (day 8), beginning (day 27) and end (day 62) of the growing phase and the stabilization phase (day 125 and 244) . Each sample was prepared to follow the degradation process in terms of fermentative products production and lignocellulose degradation. The TS and VS contents were measured by 48 hours of drying at 105°C followed by calcination at 550°C during 3 hours. Soluble phase was extracted from samples by dilution at around 5% TS followed by filtration at 2.7 µm on a glass filter (GF/D Whatman). The pH was measured before the filtration. Volatile fatty acids (VFA) were quantified by a gas chromatograph (Perkin Elmer Clarus® 580). The column was an Elite-FFAP crossbond®carbowax® (200°C, 15 m) with Nitrogen as carrier gas (6 mL.min^{-1}). The injector was heated at 250°C while the Flame Ionization Detector (FID) was heat at 280°C. Finally, both methane and VFA were express in chemical oxygen demand (COD) equivalent based on the reaction of organic compounds oxidation.

The sampled digestates were frozen immediately after sampling and then freeze-dried. The lignocellulosic structure degradation was then evaluated through Van Soest fractionation and FTIR spectra analysis. Van Soest fractionations were performed in FIWE raw fiber extractor (Velp scientifica®). The successive extractions were performed by treatment with water (30 min at 100°C) to solubilize water soluble compounds, neutral detergent solution (NDF, 60 min at 100°C) for extraction of detergent soluble compounds, acid detergent solution (ADF, 60 min at 100°C) for hemicelluloses solubilization, 72% sulfuric acid (180 min at ambient temperature) for cellulose hydrolysis. After successive extractions, the final residue, composed of lignin and mineral fraction, was calcinated (2 hours at 550°C) for lignin evaluation. After each treatment, the residue was dried at 105°C during 24 hours and weighted to allow the quantification of the corresponding fraction. The FTIR spectra were obtained on a Nicolet iS10 FTIR spectrometer (Thermo-scientific) equipped with a Smart iTR module (diamond plate). Each spectrum was performed on 16 scans on wavelength ranging from 4000 to 600 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1}. The Omnic software (version 9.1) was used for spectra acquisition and peaks area quantification. Four absorption bands of FTIR spectra were followed during degradation for their attribution to lignocellulosic compounds (Yang *et al.*, 2009; da Costa Lopes *et al.*, 2013): 898 cm^{-1} for C-H deformation in amorphous cellulose, 1375 cm^{-1} for C–H deformation in cellulose and hemicelluloses, 1512 cm^{-1} for aromatic for aromatic skeletal vibration C=C in lignin and 1730 cm^{-1} for unconjugated C=O in xylose (hemicellulose).

5.3.2.6.4 Transmission electronic microscopy (TEM)

At each sampling date, around 1 g of digestate was sampled and macroscopically observed with binocular magnifying glass in order to proceed to sub-sampling for Transmission Electronic Microscopy (TEM) characterization. Thirty sub-samples of 3 mm^3,

corresponding to aggregates of wheat residues, were collected and chemically fixed in 2% (w/v) osmium tetroxyde in a cacodylate buffer (pH = 7.2) for one hour. They were then rinsed in cacodylate buffer and physically preserved by a method that secures the structure (Villemin & Toutain, 1987). Osmium-fixed samples were dehydrated in graded acetone series, and embedded in epoxy resin (Epon 812) until complete polymerization. Once polymerized, 10 to 30 ultra-thin sections (80 to 100 nm) of these samples were obtained using a diamond knife on a Leica Ultracut S ultramicrotome. Ultra-thin sections were deposited on NI grids and stained for TEM observations with uranyl acetate and lead citrate. A minimum of 10 ultra-thin sections per sample was examined with a JEOL EMXII transmission electron microscope operating at 80 kV. Plant tissues were described and a synthesis concerning the examination of the different ultra-thin sections was made in order to highlight the overall degradation status of the different plant tissues. Microbial activity was also described as presence of micro-organisms notification, as their observation frequency, their physiological state (alive, dead, spores) and their enzymatic activity through the observation of organic matter lysis area. Because of samples nature and preparation, two categories of visual artifacts can be observed in the pictures: black line resulting from the fold of sample due to its mechanical resistance and white holes caused by sample fracturing during ultrathin sections preparation.

Electron Diffraction Xray micro-analyses (EDX) were performed on unstained ultra-thin sections. EDX analyses were recorded with a silicon drift detector (PGT, XFlash 10 mm^3, 133 eV). At least 5 replicates were made for each analysis. The same sample preparation protocol was used for the observation of the initial inoculum after sterile filtration on 0.2 µm Millipores membranes.

5.3.2.7 Results and Discussion

5.3.2.7.1 Anaerobic digestion performances

The cumulative production of methane showed a classical behavior for dry anaerobic processes (Figure 5-29). First, a slow methane production was observed during the first week (day 8) with a cumulative methane production of only 5±0 $mL.g_{TS}^{-1}$. This period corresponded to the adaptation phase of the system. At day 27, corresponding to the growth phase, the methane production reached 52±0 $mL.g_{TS}^{-1}$. After this period, the methane production rate decreased slowly until the end of the reaction at day 244. The final cumulative methane production was 204±16 $Nml.g_{TS}^{-1}$, which is close to the biomethane potential of the wheat straw (203±15 $Nml.g_{TS}^{-1}$). Globally, this production profile (Figure 5-29) is similar to the ones previously observed for experiments conducted with low inoculation (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Motte *et al.*, 2013) or high inoculation (Brown *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Since both profiles of methane production and performances were similar to efficient systems, it is possible to conclude that an efficient anaerobic process was performed despite the high initial S/X ratio applied.

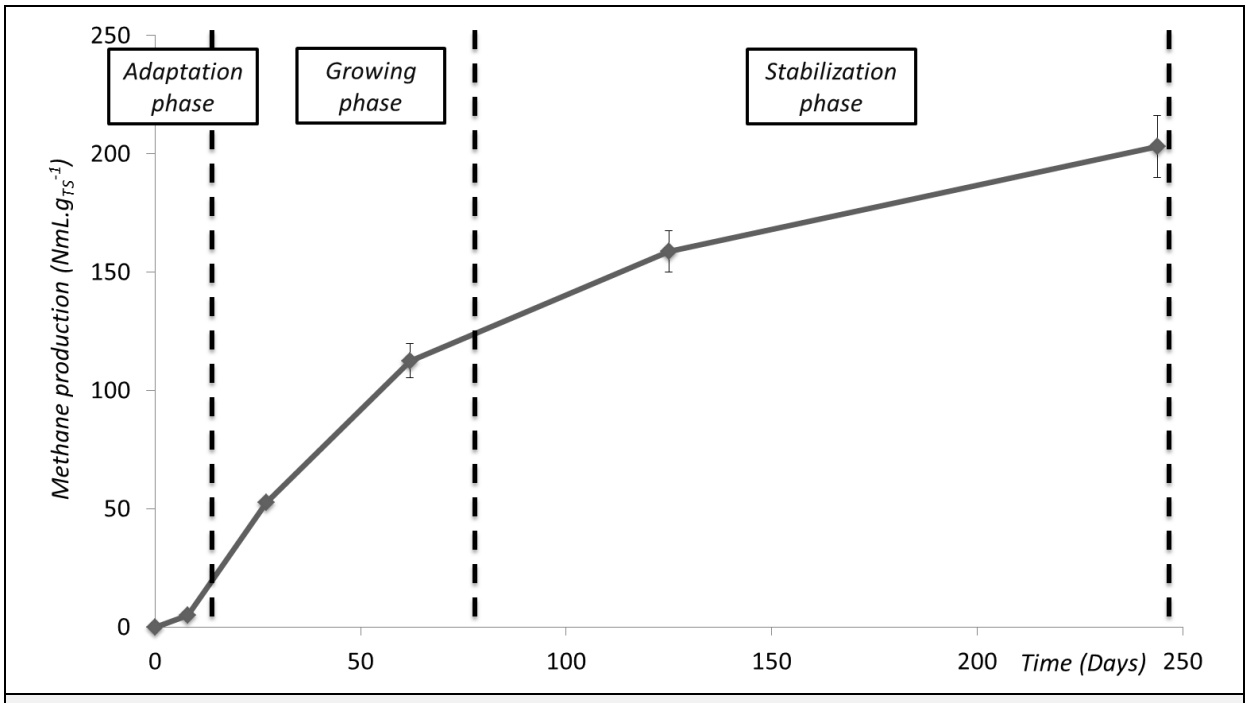


Figure 5-29 : Cumulative methane production during the reaction.

Based on the methane production profile (Figure 5-29), six samples were taken during the reaction progress and analyzed in order to explain the different stages of the biological reaction (Motte *et al.*, 2013). The VFA production of these six samples is presented in Tableau 5-19. At each date, the reaction progress was evaluated by the ratio between the amount of reaction products (VFA and methane, expressed in COD equivalent) compared to the final amount (Tableau 5-19). At the beginning of the experiment, the initial pH was 8.5±0.1 and VFA concentration represented 11±1 g.kg$_{TS}^{-1}$ of COD. These metabolites were added with the inoculum and their concentrations were in the range of the literature (Brown *et al.*, 2012). The first sampling, at day 8, showed a drop of pH (down to 6.1±0.1) associated to a high VFA accumulation (86±4 g$_{COD}$.kg$_{TS}^{-1}$). Meanwhile, the reaction progress reached 15%, with products mainly composed of VFA (≈ 85% of the total products). This date corresponded to the transformation of the substrate into VFA, while the following transformation of these metabolites into methane was poorly activated. Since both low pH and high VFA concentrations are known to be inhibitory of methanogenic activities (Siegert & Banks, 2005; Staley *et al.*, 2011), these observations could justified the slow methane production during this period. Therefore, the first period from day 0 to day 8 corresponded to the initial hydrolysis phase where methanogenesis is the step limiting the global biodegradation of the substrate (Shi *et al.*, 2013).

Sampling date	0 d	8 d	27 d	62 d	125 d	244 d
Reaction progress	0%	15%	32%	56%	78%	100%
pH	8.5±0.1	6.1±0.1	7.9±0.1	8.1±0.1	8.0±0.3	7.7±0.1
Methane ($g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$)	0±0	14±1	151±5	324±29	456±36	582±46
VFA ($g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$)	11±2	86±4	43±1	8±6	5±1	2±1
Total products ($g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$)	11±2	99±5	194±5	332±34	461±36	585±46
Volatile solids (% degradation)	0%±0	2%±5	9%±3	28%±6	34%±5	44%±2
Hemicelluloses (% degradation, VS basis)	0%±0	7%±5	18%±3	38%±6	46%±4	55%±2
Cellulose (% degradation, VS basis)	0%±0	6%±4	15%±2	35%±5	42%±3	52%±1
Lignin (% degradation, VS basis)	0%±0	-6%±6	-7%±6	10%±10	14%±9	24%±6
A1730/A1512	1.06 ±0.08	0.96 ±0.05	0.84 ±0.06	0.67 ±0.04	0.63 ±0.04	0.60 ±0.04
A1375/A1512	1.48 ±0.04	1.39 ±0.07	1.30 ±0.05	1.21 ±0.05	1.18 ±0.04	1.19 ±0.01
A898/A1512	1.63 ±0.23	1.52 ±0.13	1.31 ±0.08	1.17 ±0.08	1.14 ±0.11	1.18 ±0.13

Tableau 5-19 : Evaluation of the reaction dynamics along the 6 sampling dates. The reaction progress is evaluated as the ratio between total products of the sampling (methane and VFA) in comparison to their final production.

However, at day 27, reaction progress reached 32%. Comparing to day 8, this additional substrate hydrolysis was mainly associated to methane production (from 14±1 $g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$ to 150±1 $g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$ of methane). Effectively, a strong consumption of VFA resulted in a decrease down to 43±1 $g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$ at day 27. At this date, the pH was back to an alkaline level around 7.9±0.1. The decrease in the VFA accumulation in favor of methane production proved that methanogenic activity was activated at day 27 but not limited by a lack of VFA. In addition, the strong methane production between the days 8 and 27 suggest that the methanogens were activated despite the high VFA concentrations observed at day 8.

The three following samples showed a VFA concentration under 10 $g_{COD}.kg_{TS}^{-1}$. These concentrations were associated to a constant alkaline pH of 7.9±0.3. In particular, at day 62, 56% of the total substrate conversion was achieved. Since methane was the main product observed at this stage, methanogenic activity was able to convert VFA produced in the previous stage of the AD process. Therefore, VFA production and previously hydrolysis step were the limiting factor of the reaction as already mentioned in the literature (Shi *et al.*, 2013). At day 125, 78% of the reaction progress was achieved. Methane was mostly produced and the slower reaction rate was attributed to the transformation of hardly degradable substrate. At the end of the reaction, every VFA produced was immediately transformed into methane and CO_2 as suggested by the negligible quantity of soluble

metabolites observed at day 244. In conclusion, at the beginning of the reaction, colonization and methanogenic activity were the limiting reactions. From day 62, corresponding to the end of the growth phase where more than half of the substrate was converted, the substrate hydrolysis started to be the limiting factor.

5.3.2.7.2 Lignocellulose degradation

The dynamics of organic matter degradation is presented in Tableau 5-19. The overall VS degradation reached 44% at the end of the experiment. This value was quite high compared to previous studies in dry conditions that presented a VS degradation of about 20% (Shi *et al.*, 2013). This high degradation level could be attributed to the long duration time. In terms of dynamics, the degradation of VS followed a trend similar to the reaction progress. The only exceptions were days 8 and 27, where the VS degradation was lower than the reaction progress, mainly because of VFA accumulation. Because of the very low inoculation, 99% of the organic matter introduced in batches was wheat straw. Therefore, the VS degradation was mainly attributed to the lignocellulosic structure degradation. Based on Van Soest fractionation, the degradation of 55%±2 of hemicelluloses and 52%±6 of cellulose was identified. This values were higher than the one reported in dry anaerobic digestion with agricultural residues: around 37% for hemicelluloses and between 32 and 41% for cellulose (Cui *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). However, since the reaction time was higher in the present experiment, and the methane yield close to the BMP test, it was assumed that ultimate degradation was reached so that the majority of accessible hemicelluloses and cellulose was degraded. This degradation of polysaccharides followed the trend of the reaction progress with 30% of degradation after 27 days of operation. Therefore, even if the degradation rate was slower, 70% of hemicelluloses and cellulose were degraded under substrate hydrolysis limitation (from day 27 to the end of the experiment).

The Van Soest fractionation showed an apparent and significant degradation of the lignin fraction (24%±6). This degradation occurred mainly under the hydrolysis limitation period, starting from day 62 and characterized by a high substrate limitation. This degradation could be theoretically associated to the degradation of lignin aromatic compounds of wheat straw, such as hydroxycinnamic acids (Bertrand *et al.*, 2006). This hypothesis is enlightened by their degradation already observed with adapted anaerobic microorganisms (Healy & Young, 1979). The particular environment provided by dry conditions and the long reaction time could be favorable for the growth of such microorganisms. Therefore, it is possible to assume a breakdown of the lignin matrix in order to access to hardly accessible substrate, which results in an apparent degradation of the lignin-like fraction.

The ratios of peaks A1730/A1512, A1375/A1512 and A898/A1512 measured from FTIR represent the relative intensity carbohydrates peaks against lignin peaks (Tableau 5-19). Two phases, distributed around the sampling at day 62 (half of the degradation progress), can be extracted. The first phase presented a strong decrease of hemicelluloses and cellulose peaks

compared to lignin (ratio A1730/A1512 from 1.06 to 0.67, A1375/A1512 from 1.48 to 1.21 and A898/A1512 from 1.63 to 1.17): these decreases suggested a degradation of hemicelluloses and cellulose during this period. This observation was in agreement with the Van Soest analysis since significant degradations of these two carbohydrates were detected. Therefore, the first degradation period corresponded to the degradation of the hemicelluloses and cellulose fraction as basically described in the literature (Shi *et al.*, 2013). The FTIR spectra of the second period (from the day 62 to the end) showed an insignificant variation of the lignocellulosic structure, with a constant proportion of cellulose, hemicelluloses and lignin compounds at day 62, 125 and 244. Meanwhile, the degradation of 40% of the organic matters was observed during this period, which indicated an important hydrolysis of the lignocellulosic structure. The only explanation to this constant proportion between the three lignocellulosic polymers is the breakdown of lignin in similar proportion than the degradation of cellulose and hemicellulose. The decomposition of a part of the lignified tissues to access to the cellulose and hemicelluloses was therefore strongly supposed.

5.3.2.7.3 Reaction dynamics followed by microscopic observation

5.3.2.7.3.1 Microscopic observations

Microscopic observation of straw tissues and inoculum are presented in Figure 5-30 before the inoculation stage (day 0). The wheat straw presented a global undegraded structure, with a full cell wall integrity and the near absence of microorganisms (Figure 5-30-a). Three tissues were mainly observed: parenchyma, sclerenchyma and epidermal tissue. Microscopic observation confirmed that parenchyma cells of the straw presented fine cell walls composed of medium lamella, primary wall and large central vacuole (Figure 5-30-b). In addition to primary wall and medium lamella, the sclerenchyma cells presented a thick secondary wall of a few micrometers (Figure 5-30-c). Because of its role of mechanical resistance in plants, this tissue was highly lignified particularly in the primary wall and medium lamella (Nougarède *et al.*, 1969). The epidermis presented a similar structure than the sclerenchyma: thick secondary wall and highly lignified cells (Figure 5-30-d). In addition, a waxy layer, the cuticle covered the cell wall that faced outwardly the plant tissues, as mentioned in the literature (Sun, 2010). Epidermis were also characterized by a high silica content, revealed in TEM as grainy texture when associated to organic carbon, or as crystallized particles (Watteau & Villemin, 2001; Machinet *et al.*, 2009b). This observation was verified by Electron Dispersive X-Ray analyses (EDX), where high amounts of silicon were associated to the cuticle cell walls (Figure 5-30-e). Finally, the inoculum was mainly composed of living microorganisms, some cells membrane residues and few residual organic matters coming from the industrial digestate (Figure 5-30-f). It was visually composed of a large variety of microorganisms, since a large diversity of microbial shapes and sizes was observed. This microbial complexity can be attributed to the complex ecosystem observed in solid-state anaerobic digester (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013).

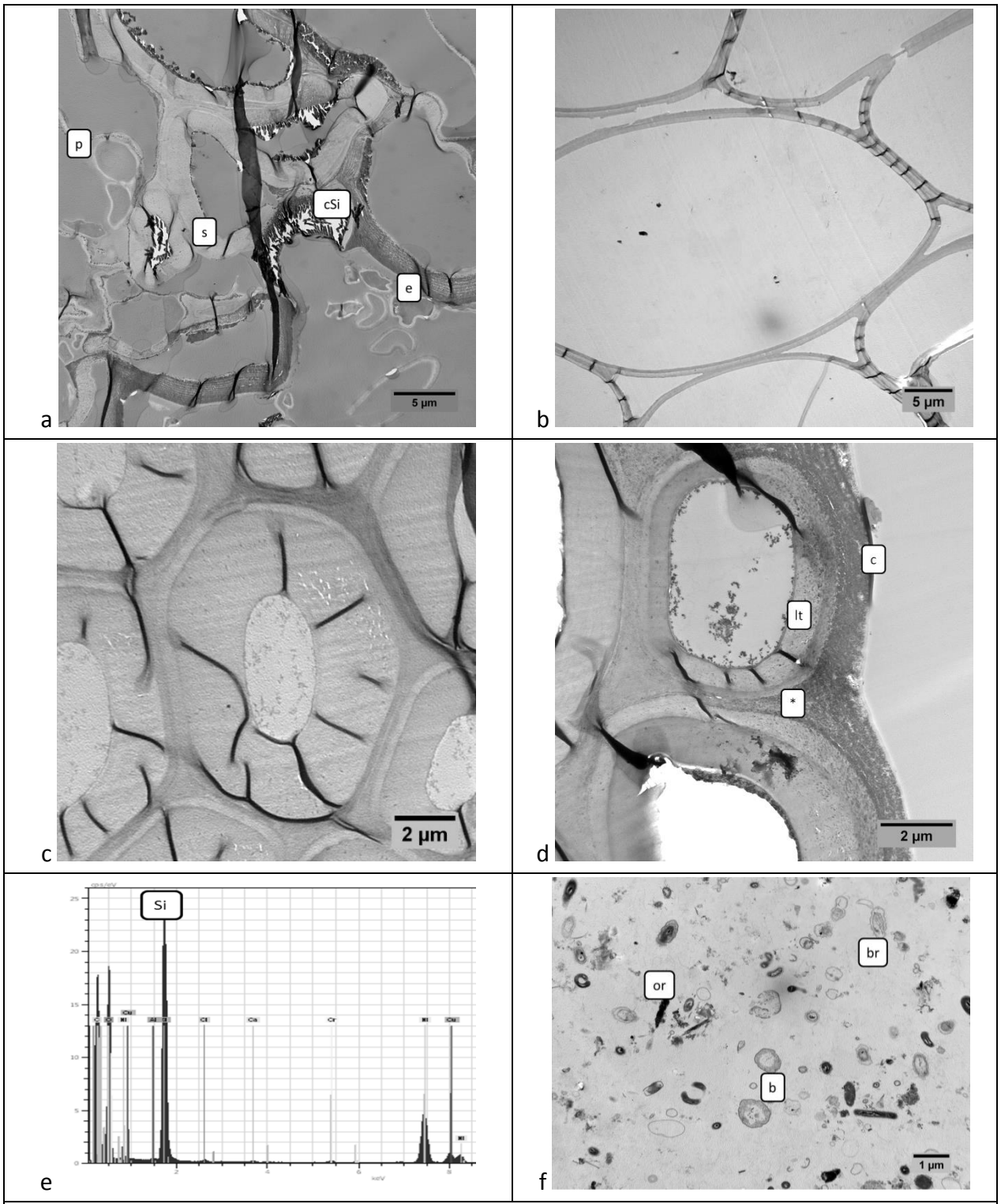


Figure 5-30 : Transmission electronic microscopic observation of the initial conditions (day 0). (a) Initial tissue arrangement in straw internodes (unstained section). (b) Parenchyma cells. (c) Sclerenchyma cells. (d) Epidermal cells. (e) EDX spectrum of cuticle cell wall. (f) Inoculum.

Pictures legend: b: bacteria; br: bacterial residue; c: cuticle; cSi: crystallized silicon, e: epidermis, lt: ligneous thickening, p: parenchyma, or: organic residue; s: sclerenchyma; *: EDX analysis location.

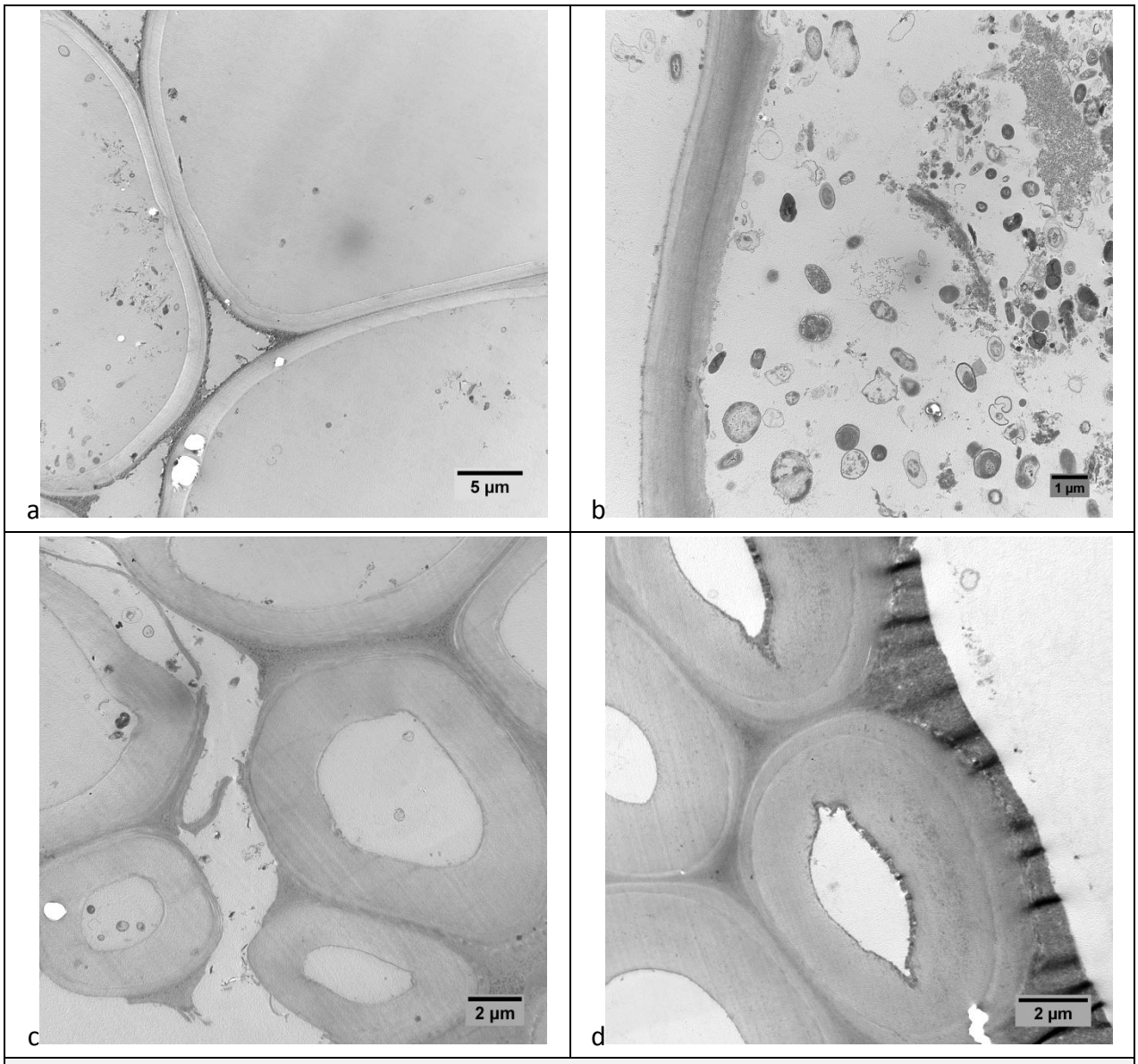


Figure 5-31 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 15% of degradation (day 8).
(a) Parenchyma cells. (b) focus on microorganisms location in central vacuole of parenchyma cells. (c) Sclerenchyma cells. (d) Epidermal cells.

The microscopic observations of the sample performed during the adaptation phase (day 8, 15% of reaction progress) are presented in Figure 5-31. The observations of the lignocellulosic structures showed a quasi-absence of degradation of parenchyma (Figure 5-31-a), sclerenchyma (Figure 5-31-c) and epidermal (Figure 5-31-d) cells. Meanwhile, the microbial biomass of the inoculum was distributed all around the straw tissues, and into cells central vacuole. Because of the large central vacuole of parenchyma cells, which provided a large access to the center of these cells (Wilson & Mertens, 1995), more microorganisms were located in parenchyma. In addition, the outer surface of the epidermis, providing theoretically a large available surface, is poorly associated to microorganisms. This phenomenon can be attributed to the presence of the cuticle, which is composed of hydrophobic compounds (Sun, 2010), and this waxy layer can represent an obstacle for

microbial attachment (McAllister *et al.*, 1994). The quasi-absence of parietal degradation simultaneously to 15% of reaction progress can be explained by the transformation of non-parietal molecules. The soluble phase of the straw was measured at 13%±2 (on VS basis) according to Van Soest fractionation. The effect of the soluble phase on the first stage of SS-AD reaction was previously enlightened (Motte *et al.*, 2013). Therefore, the high production of VFA observed during adaptation phase can be mainly related to the transformation of the substrate soluble compounds.

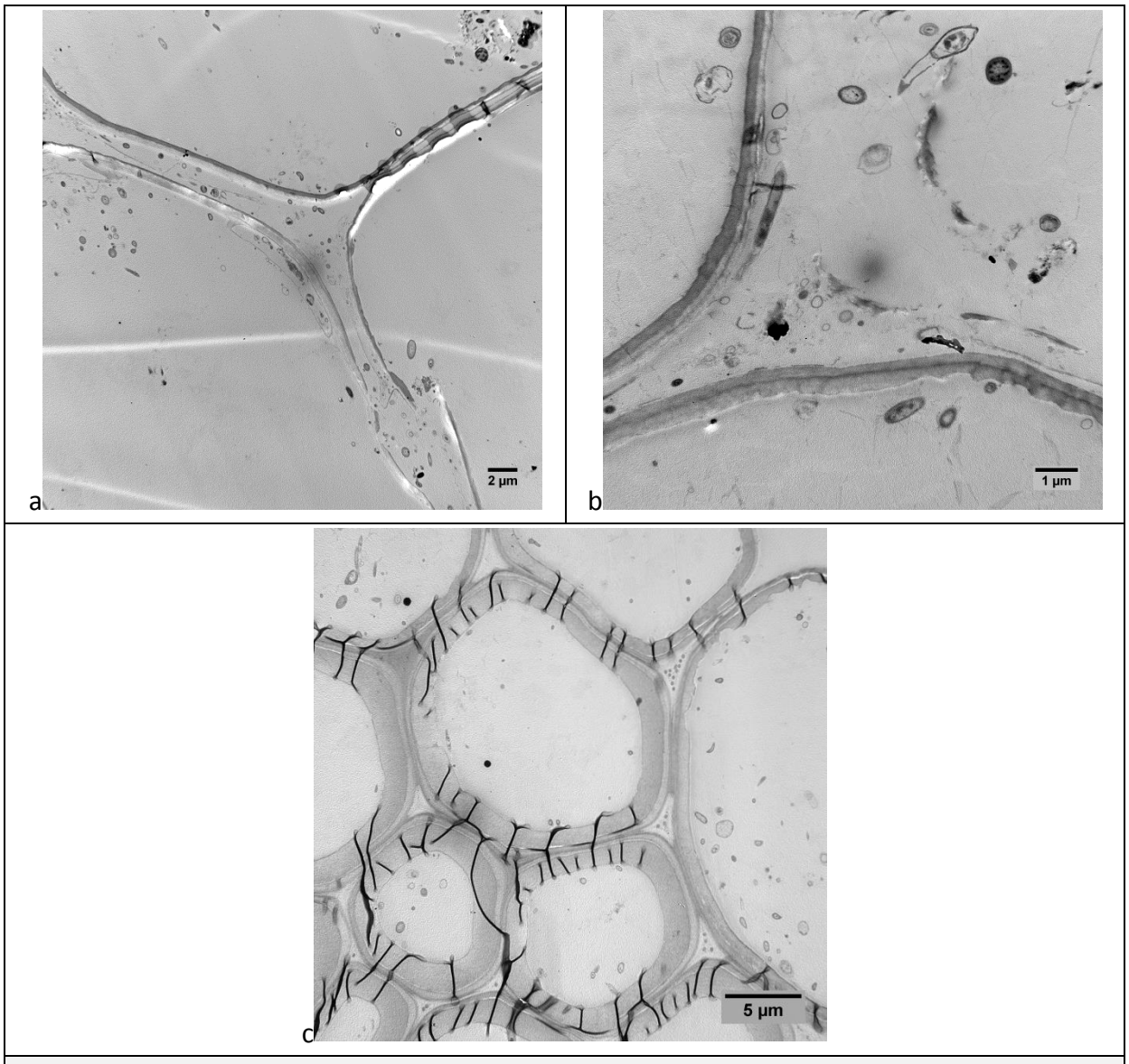


Figure 5-32 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 32% of degradation (day 27).
(a) Parenchyma cells. (b) Focus on parenchyma cell walls degradation. (c) Sclerenchyma cells.

At the beginning of the growing phase (day 27) the degradation progress reached 32%. The corresponding microscopic observations are presented in Figure 5-32. These pictures showed a parietal biodegradation of the parenchyma cells (Figure 5-32-a). The microbial attack started in the central vacuole and was limited to the primary wall, since medium

lamella remained undegraded. Comparing to the adaptation phase, this degradation was associated to the presence of higher quantities of microorganisms, which indicated a microbial biomass growing. Despite the presence of microorganisms in the central vacuole (Figure 5-32-c), the majority of sclerenchyma and epidermal tissues remained undegraded. However, it was already possible to observe some minor sclerenchyma degradation in a few samples, which may relate to the heterogeneity of the media induced by the low water content.

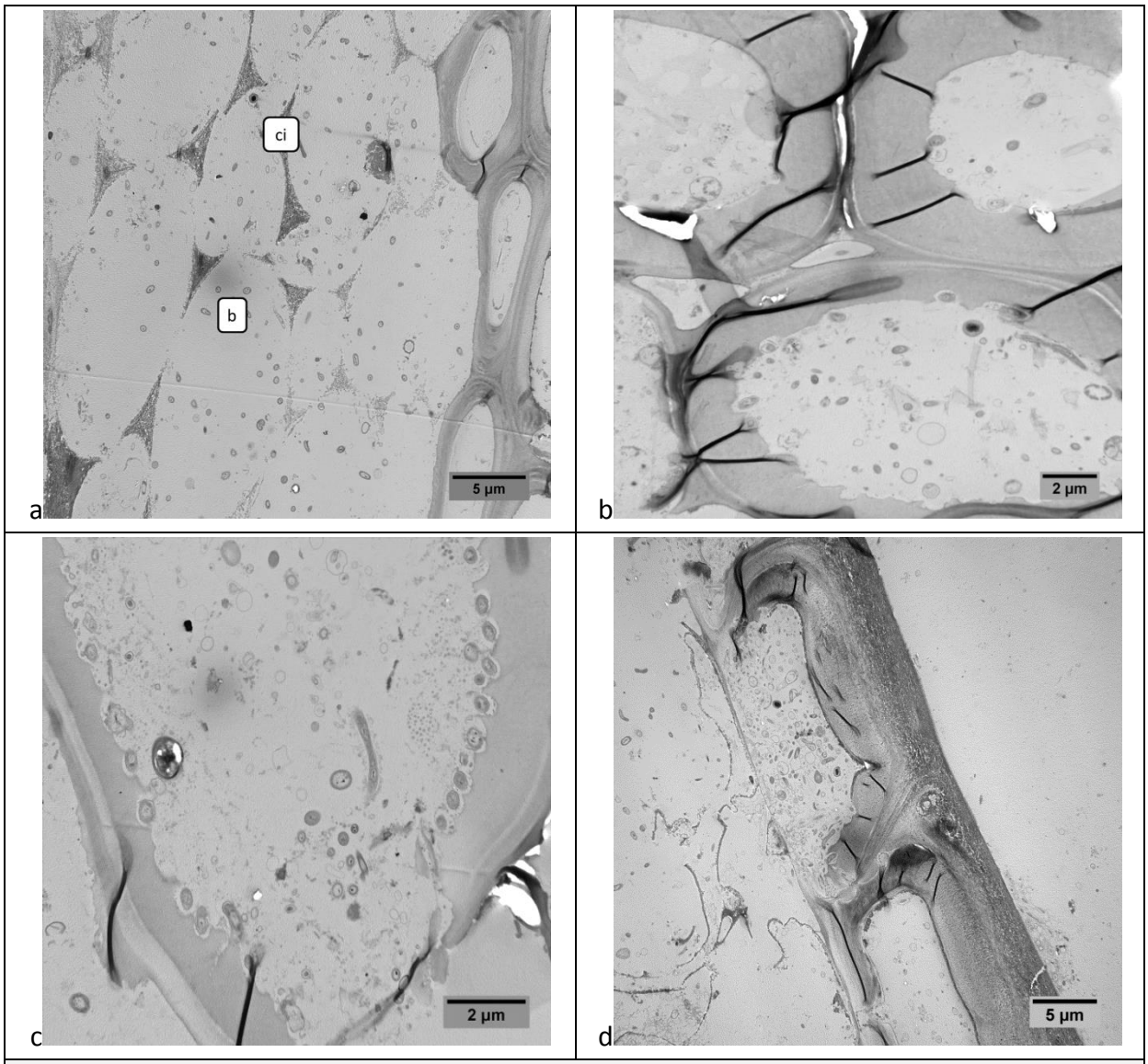


Figure 5-33 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 56% of degradation (day 62).
(a) Parenchyma cells. (b) Sclerenchyma cells. (c) Focus on sclerenchyma cell walls degradation. (d) Epidermal cells.
Picture legend: b: bacteria; ci: cell intersection.

The microscopic observations at day 62 are presented in Figure 5-33 (end of the growing phase, 56% of the reaction progress). Parenchyma cells were strongly degraded and only the medium lamella and cell intersections remained as a non-degradable skeleton of

these cells (Figure 5-33-a). Meanwhile, the sclerenchyma cells degradation started (Figure 5-33-b) and concerned mainly the secondary wall despite its lignification degree. In addition, the microorganisms involved in these lignified walls degradation seems highly active (Figure 5-33-c), as revealed by the strong hydrolysis activity and physiological integrity (cell division observed). Similarly, the secondary walls of the epidermal cells were also degraded but the degradation only affected their low-silicified area located toward the inner of the plant (Figure 5-33-d). In comparison, microorganisms appeared less active in degraded tissues such as parenchyma. Therefore, this point indicated a transition point in the degradation dynamics with the parenchyma biodegradation achievement and the beginning of the breakdown of lignified tissues.

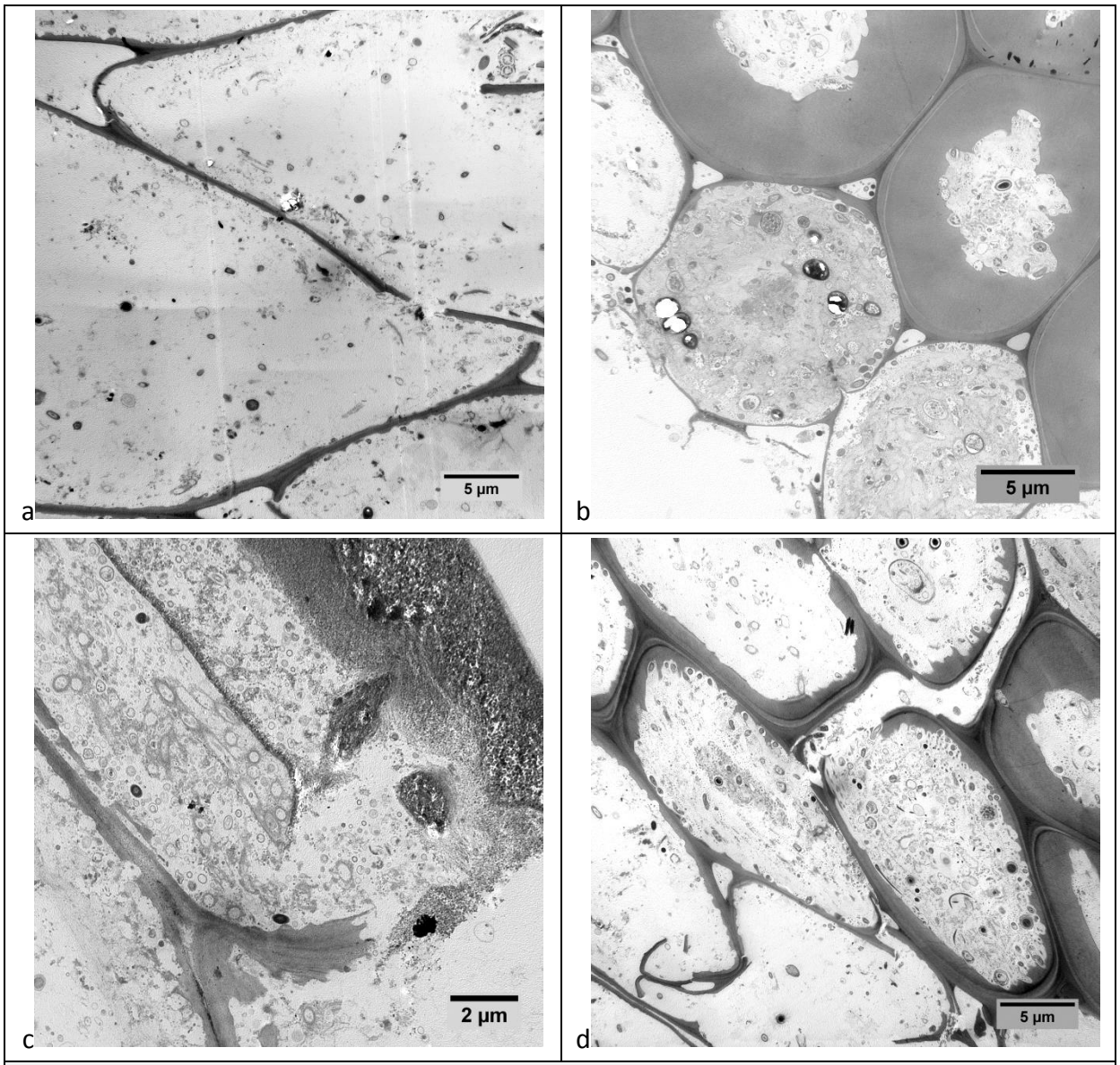


Figure 5-34 : Transmission electronic microscopic observation of solid-state anaerobic digestate at 100% of degradation (day 244).
(a) Parenchyma cells. (b) Sclerenchyma cells. (c) Epidermal cells. (d) Final tissue condition.

The two last samples of the experiment, at day 125 (78% of reaction progress) and day 244 (at the end of the reaction) were considered as representative of the stabilization phase. At these dates, similar phenomena were observed (Figure 5-34 at day 244). Parenchyma cells were not furthermore degraded, confirming the strong resistance of the medium lamella (Figure 5-34-a). Meanwhile, the microbial biomass activity in these cells seemed low, as revealed by their low density and the presence of many microbial residues. Therefore, the main biodegradation during this period occurred in the secondary wall of the lignified tissues: sclerenchyma (Figure 5-34-b) and epidermis (Figure 5-34-c). This occurred after tertiary wall breakdown, which was a hardly degradable barrier to access to the secondary wall. In these cells, the bacteria have grown in high density. After full degradation, only the medium lamella and silica of epidermal tissue remained as a skeleton of these cells. However, the degradation of sclerenchyma cells remained heterogeneous. This can be attributed to the low microorganisms colonization caused by the low water content in the media (Pommier *et al.*, 2007).

5.3.2.7.3.2 Dynamical description of the lignocellulose biodegradation

These process performances and microscopic observations allow us to propose a schematic description of the dynamical microbial degradation of the lignocellulose in SS-AD. Straw tissues are composed of many plant cells join by their medium lamella. Microorganisms, introduced during the inoculation step, are distributed among the tissues according to the material accessibility. Therefore, only the center of each cell, the vacuole, is firstly accessible for microbial biomass and the microbial propagation from cell to cell was ensured by cell punctuations (plasmodesmata) and cell wall breakdown. Therefore, the cells with the larger vacuoles and the thinner walls, such as parenchyma cells, contain more microorganisms at the beginning of the reaction. On another hand, the waxy layer of epidermal tissue prevents the microbial adhesion and limits the microbial attack. During this stage, microorganisms consume firstly the soluble sugars, because of their immediate availability, and then start to degrade the cells wall. Degradation of parenchyma cells starts early in the reaction progress, because of the higher quantity of microbial biomass observed in this tissue and their lower lignification degree. This degradation is limited to the primary wall, which is mainly composed of hemicelluloses and cellulose (Kuhad *et al.*, 1997). After parenchyma cell degradation, the microbial biomass activity starts to decrease because of a lack of easy accessible substrate. Meanwhile, the degradation of sclerenchyma and epidermis, the lignified tissues, occurs. In the present experimental conditions, the beginning of sclerenchyma degradation is simultaneous to the achievement of parenchyma cells attacks. This degradation is delayed, probably because of a higher cells wall complexity, the lower initial microorganisms quantity in contact to these cells and the time required to consume the soluble phase. In addition, the tertiary wall of sclerenchyma cells acts as a barrier for the access to the secondary wall. After breakdown of this layer, secondary and primary walls are strongly degraded despite their high lignification level (Kuhad *et al.*, 1997). In lignified tissues, the non-degraded parietal layers are the medium lamella, the tertiary

wall and the highly silicified part of the secondary wall of epidermis tissue. At the end of the reaction, the microbial biomass is highly abundant in both sclerenchyma and epidermal tissue.

This process description is a novelty for AD of lignocellulosic residue under dry conditions. However, it is possible to observe some similarities with the degradation of organic matter within rumen, soil or compost (Engels & Schuurmans, 1992; Dresboll & Thorupkristensen, 2005; Machinet *et al.*, 2009a). In those ecosystems, the microbial attack always starts from the center of the cells (Akin & Burdick, 1975), confirming that accessibility to the central vacuole is a limiting factor for reaction kinetics (Wilson & Mertens, 1995). Furthermore, the degradation of parenchyma cells firstly occurs in the early stage of the biodegradation as previously observed in rumen (Engels & Schuurmans, 1992) and soil environment (Bertrand *et al.*, 2006). In addition, the resistance of medium lamella to biodegradation, the epidermis degradation according to its silica content and the presence of the cuticle was enlightened in rumen environment (McAllister *et al.*, 1994; Wilson & Mertens, 1995). Finally, solid-state conditions (here at 20% TS) do not affect the overall microbial attack of the substrate, in comparison to many ecosystems (soil, compost and rumen), the attack of the tissues depends on their lignification degree. The degradation of each cells starts from the center and the medium lamella was recalcitrant to microbial degradation.

A strong novelty of this study remains in the observation of the breakdown of lignified tissue while lignin is considered as non-degradable in AD conditions by many authors (Frigon & Guiot, 2010; Barakat *et al.*, 2012; Monlau *et al.*, 2013). However, the lignin loss in long-term anaerobic digestion of lignocellulosic biofilm career was previously observed (Chanakya & Khuntia, 2013) during a long reaction time (400 days, vs. 244 in the present experiment), while most of SS-AD studies are performed in shorter time (≈ 30 days) (Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012). In the present study, since the soluble phase and the parenchyma cells were highly degradable and used as the first substrate, microorganisms may develop a strategy to reach hardly accessible molecules included in lignified tissue: the secondary wall. Since the sclerenchyma secondary wall represents between 60 and 80% of the total lignin of straws (Sun, 2010), its breakdown confirmed the reduction of the lignin-like fraction measured from both Van Soest and FTIR analysis (Tableau 5-19). This novel observation could be explained by the slow secondary wall degradation rate, which is limited by the tertiary wall and thinness of the central vacuole. It is possible to suppose that this lignified cell wall degradation results from a lack of substrate that bond microorganisms to search for substrates even if they are hardly accessible. Water reduction can increase the local lack of substrate by a low microbial motility (Pommier *et al.*, 2007). Meanwhile, solid-state conditions increase the local heterogeneity, as observed by the presence of undegraded cells at the end of the experiment. Therefore, both water reduction and long-term degradation can explain the expression of a metabolism able to degrade lignified cell walls.

Finally, microorganisms seem to be able to cleave hardly accessible lignocellulosic material if a long enough reaction time is provided. In this goal, the increase of substrate accessibility can be a key-factor for increasing the biodegradation kinetics and thus improving the global efficiency of the process. Since the accessibility to central vacuole of each cell is required for a complete and fast transformation, favoring cell breakdown by proper size reduction seems to be adequate (Wilson & Mertens, 1995). However, an optimum has to be found since particles size reduction increases the soluble phase content that can conduct to an imbalance between the hydrolytic and the methanogenic stages (Motte *et al.*, 2013). In addition, this work has demonstrated that the epidermis, which offers theoretically a large surface area, is hardly accessible for microorganisms probably because of the hydrophobic cuticle (wax) and high silica content. Therefore, new pretreatments, enhancing the access of microorganisms to the epidermis by wax or silica solubilizing, have to be investigated. The tertiary wall, mainly composed of hemicelluloses (Sun, 2010), is also hardly degradable in AD conditions. Since hemicelluloses contained in medium lamella or tertiary wall is poorly degradable, its specific solubilization could be an efficient strategy. To conclude, process conditions or pretreatment strategies must be optimized to increase the substrate accessibility and the breakdown of physical barrier, instead of solubilizing the degradable cell wall.

5.3.2.8 Conclusion

The cellular degradation of lignocellulosic residue was followed dynamically under SS-AD degradation for the first time. This study shows that, during a long term AD, microorganisms are able to develop efficient strategies to breakdown the lignified cell walls and to reach the hardly accessible cellulose and hemicellulose. In addition, SS-AD does not affect the microbial development and the lignocellulose attack. Novel physical limitations in substrate accessibility and transformation were enlightened for AD: access to the central vacuole, tertiary wall, hydrophobic wax and silicon. Therefore, for SS-AD improvement, substrate milling could be optimized for vacuole accessibility, while new pretreatments should be developed to overcome the presence of tertiary wall, wax and silicon.

5.3.2.9 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the University of Montpellier 2 for JC Motte PhD financial support, and the technical assistance of J. Paoli (Lorraine University) for the realization of ultra-thin sections.

5.3.3 STRUCTURATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE EN DIGESTION SÈCHE

La section précédente (5.3.2) étant principalement centrée sur la dynamique de dégradation du substrat lignocellulosique, les notions liées à la structuration de la biomasse microbienne n'ont pas été explicitées. Ainsi, cette partie de l'étude a pour objectif de mettre évidence le lien entre l'avancement de la réaction biologique et la structuration locale des communautés microbiennes. Un protocole de compartimentation de la biomasse microbienne a donc été spécialement développé. Il est inspiré de protocoles référencés dans la littérature qui ne sont pas adaptés à la digestion sèche en raison de la dépendance au substrat, de l'efficacité de la séparation et de contraintes analytiques (centrifugation inadaptée aux pailles notamment). La version développée ici repose sur une triple compartimentation liée à la taille des particules auxquelles les micro-organismes sont associés. Les communautés microbiennes de ces trois compartiments ont été analysées afin d'étudier dynamiquement leur différentiation vis-à-vis du substrat et au cours de l'avancement de la réaction. Les résultats de ce chapitre précisent tout d'abord les performances globales du procédé et l'évolution du profil métabolique au cours de la réaction, avant de discuter des résultats de la compartimentation microbienne. Pour finir, les limites du protocole et les perspectives d'utilisation sont présentées.

5.3.3.1 Performance du procédé et profil métabolique

Les digesteurs ont été finement suivis pour évaluer les performances de méthanisation. Le profil de production de méthane est présenté dans la Figure 5-35-a, avec un focus sur les 30 premiers jours de la réaction. Ce profil est semblable à celui décrit dans le chapitre 5.1.3, qui a servi de modèle pour le choix des dates de prélèvements. Il diffère néanmoins par une phase d'adaptation très marquée, en particulier, entre les 4ème et le 10ème jour, où un plateau de production de méthane très net apparait après une première phase de production. Ce ralentissement a été observé dans le chapitre 5.1.3 et dans la littérature (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013), mais dans une intensité moindre. Les performances du procédé aux six dates de prélèvements sont présentées dans la Figure 5-35-b en termes de production cumulée de méthane, d'accumulation de métabolites et des produits de la biodégradation (somme de la production de méthane et de métabolites).

Cette figure montre une accumulation forte de métabolites au 8ème jour. Ceci suggère que le plateau de production de méthane observé entre le 4ème et le 10ème jour n'est pas attribuable à une absence de réaction biologique mais à un simple retard de la méthanogenèse vis-à-vis de la fermentation. Cette hypothèse est étayée par la production métabolites entre le 8ème jour et le 27ème jour, qui montre une production continue depuis le début de l'expérience. Ce retard de la méthanogenèse s'explique par la faible quantité initiale de micro-organismes méthanogènes (S/X de 28) et est confirmé par l'accumulation de métabolites produits au 8ème jour puis dégradés en partie au 27ème jour (Figure 5-35-b).

Dès lors que la cinétique de la méthanogenèse devient supérieure à celle de l'hydrolyse, la concentration en métabolites décroit pour maintenir une faible valeur résiduelle dans le milieu à partir du 62ème jour et jusqu'à la fin de l'expérience. Par conséquent, la fin de la réaction est surtout limitée par la vitesse d'hydrolyse du substrat, comme il est classiquement décrit dans la littérature (Philippidis & Smith, 1995).

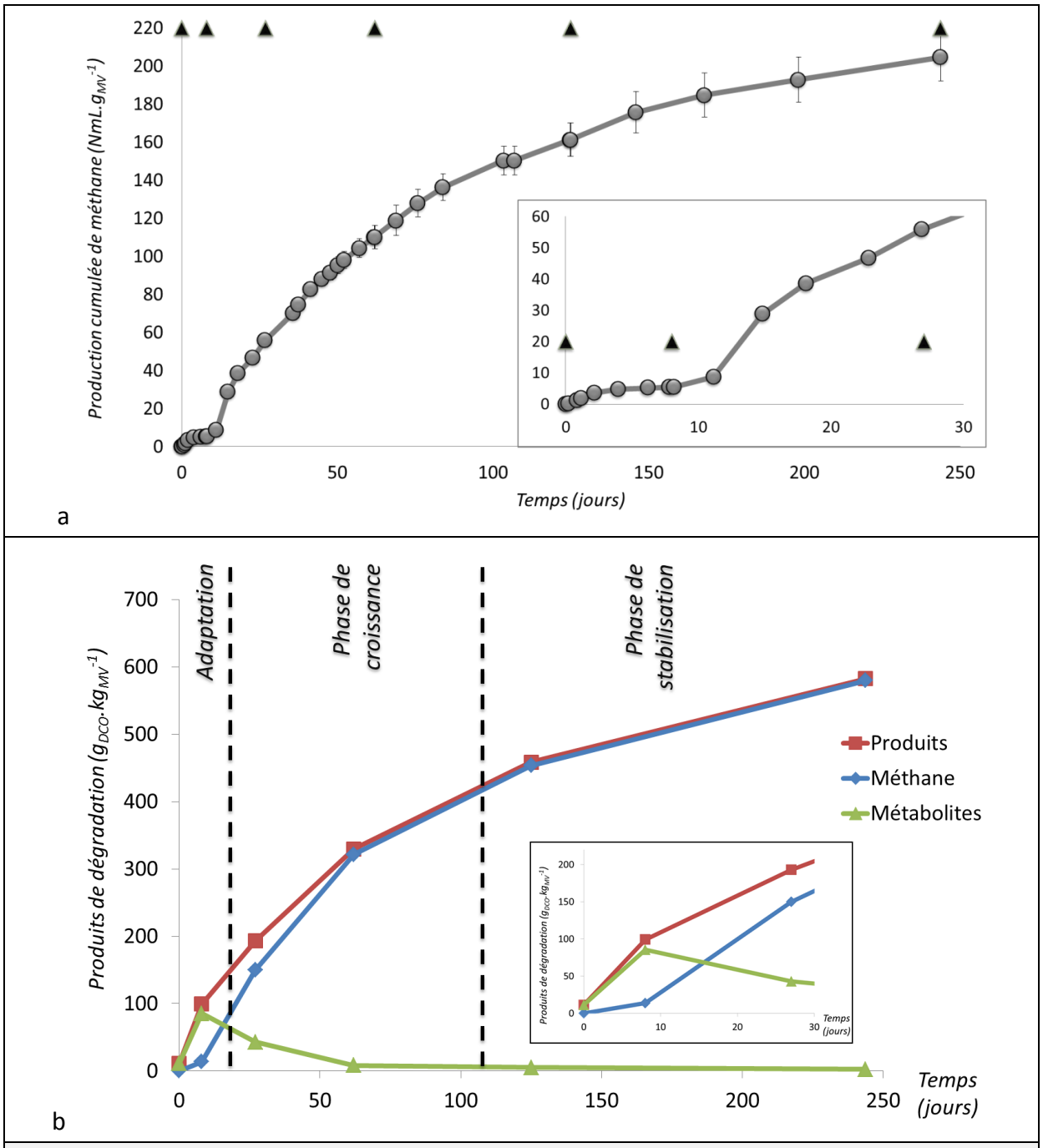


Figure 5-35 : Performances de dégradation au sein de digesteurs faiblement inoculés.
(a) Profil de production de méthane avec un focus sur les 30 premiers jours de la réaction (NmL.g_{MV}^{-1}).
(b) Concentration en produits de dégradation au cours de la réaction (g_{DCO}.kg_{MV}^{-1}).

Ainsi, la première partie de la réaction est limitée par la méthanogenèse tandis que la seconde partie est dépendante de l'hydrolyse. Cette observation montre que l'hydrolyse est bien l'étape limitant la dégradation des solides (Buffière *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007b), mais pas sur l'ensemble de la dynamique réactionnelle. Le déséquilibre entre acidogenèse et méthanogenèse apparait au démarrage de la réaction montrant qu'au démarrage, la méthanogenèse est moins active que la fermentation. Ce décalage conduit à une concentration importante de métabolites de près de 12 $g.kg^{-1}$ (kilogramme de digestat) au 8ème jour. Cette forte concentration est amplifiée ici par le faible taux d'inoculation. L'accumulation transitoire d'acides gras volatils a précédemment été décrite dans la littérature (Shi *et al.*, 2013) pour de plus forts taux d'inoculation. Ceci suggère que ce phénomène survient systématiquement, mais est atténué par des inoculations plus importantes.

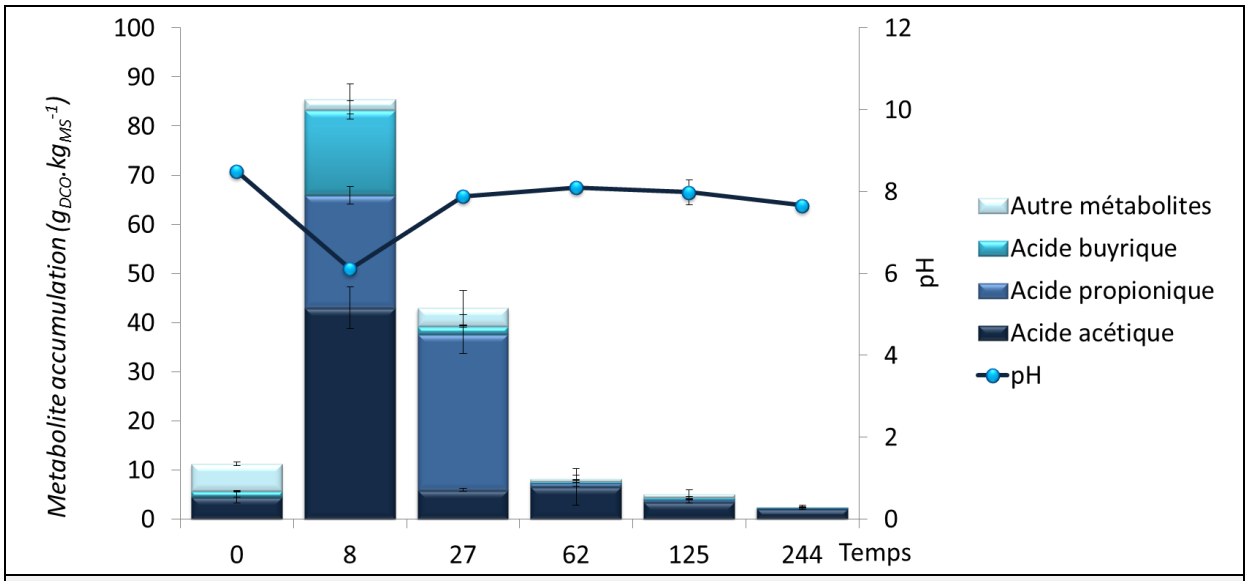


Figure 5-36 : Evolution du profil métabolique au fil de l'avancement de la réaction.

L'importance de ce pic temporaire de métabolites réside dans le risque d'acidification du digesteur. Puisque cette production de métabolites est fonction de la quantité de la phase soluble du substrat (Monlau *et al.*, 2012b), il est important de favoriser leur consommation. Le chapitre 5.2 a démontré que moduler la distribution métabolique de ce pic de production peut être une stratégie pour assurer la consommation rapide des métabolites. Il s'agit par l'ajustement des paramètres de procédé, de s'assurer de produire des métabolites rapidement dégradables et faiblement inhibiteurs. Ici, au 8ème jour, les produits de la dégradation sont principalement les acides acétique, propionique et butyrique représentant respectivement 50, 27 et 20% des métabolites (Figure 5-36). Ce profil métabolique est classique pour de la méthanisation sèche (Staley *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). Néanmoins, la production d'acide propionique ne semble pas avantageuse pour la réaction puisque cet acide est connu pour être plus difficilement dégradé (Li *et al.*, 2012). Ce point est redémontré ici par le prélèvement du 27ème jour (Figure 5-36), où la consommation

de l'acide propionique ne semble pas avoir démarrée contrairement à celle des acides acétique et butyrique.

Ce profil métabolique et les conditions expérimentales rappellent l'étude présentée dans la section 5.2.2 sur la fermentation mésophile en voie sèche dans les conditions suivantes: ≈ 19% MS, faible inoculation, température mésophile, paille de blé broyée à 1 mm et temps de réaction de 11 jours. Les profils métaboliques de ces deux expériences sont résumés dans le Tableau 5-20. Ainsi, que ce soit à 8 ou 10 jours d'expérimentation, les deux systèmes présentent des profils métaboliques différents avec pour tendance générale la production majoritaire d'acides acétique, propionique et butyrique. Néanmoins, la distribution entre ces trois AGV n'est pas identique puisque l'acide propionique est plus fortement produit en méthanisation qu'en fermentation. De plus, la transformation de matière est plus importante en digestion sèche (≈ 86 $g_{DCO}.kg_{MS}^{-1}$) qu'en fermentation (≈ 67 $g_{DCO}.kg_{MS}^{-1}$). La conversion accrue du substrat en méthanisation peut s'expliquer par la dégradation ponctuelle du tissu lignocellulosique mais également par l'amélioration du contact entre les micro-organismes et le substrat grâce à une agitation régulière des digesteurs secs. Egalement, la fermentation conduit à la production d'hydrogène et d'une grande diversité de métabolites non retrouvés en méthanisation: éthanol, acide valérique et acide caproïque. Ces variations proviennent essentiellement des différences de conditions opératoires entre les expériences. La comparaison de ces deux expérimentations démontre donc qu'il est possible d'agir sur le profil métabolique par un ajustement des paramètres de procédé (ici par la nature et la quantité de l'inoculation et le pH du milieu).

Métabolites produits ($g_{DCO}.kg_{TS}^{-1}$)	Prélèvement au 8ème jour pour la digestion sèche à 19% MS	Fermentation mésophile à 19% MS
Hydrogène	0,0±0,0	5,0±0,2
Acide acétique	43,0±4,3	19,5±2,0
Acide propionique	22,9±1,7	7,4±1,1
Acide butyrique	17,4±1,9	20,4±2,4
Acide valérique	0,0±0,0	6,2±0,3
Acide caproïque	0,0±0,0	0,8±1,0
Ethanol	2,2±3,1	12,8±4,3

Tableau 5-20 : Comparaison des profils métaboliques entre le prélèvement au 8ème jour et le milieu en fin de fermentation mésophile à 19% de MS (section 5.2.2).

Cette expérience a également mis en évidence un phénomène d'humidification du milieu au cours de la réaction (Figure 5-37). Ainsi, la dégradation de près de 40% des matières organiques a conduit à une diminution des teneurs en matières sèches d'environ 37%. L'humidification suit directement l'avancement de la réaction biologique, avec en particulier une cassure vers le 62ème jour attribuée au ralentissement de la réaction à cause des limitations en substrat. Au final, cette humidification conduit donc à passer d'un milieu résolument sec (19% MS) à un milieu semi-sec (12% MS). Ce phénomène a été explicitement

mentionnée dans littérature, où une humidification de près de 15% peut être constatée (Shi *et al.*, 2013). L'augmentation apparente des teneurs en eau peut favoriser la réaction biologique par modification des transferts de matières (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012), dilution des inhibiteurs (Staley *et al.*, 2011) et augmentation de l'accessibilité du substrat (Pommier *et al.*, 2007). En revanche il a été démontré précédemment (section 5.2.2) que l'humidification ne modifie pas l'activité microbienne puisque la siccité impacte le profil métabolique seulement au-delà de la limite entre eau libre et eau liée.

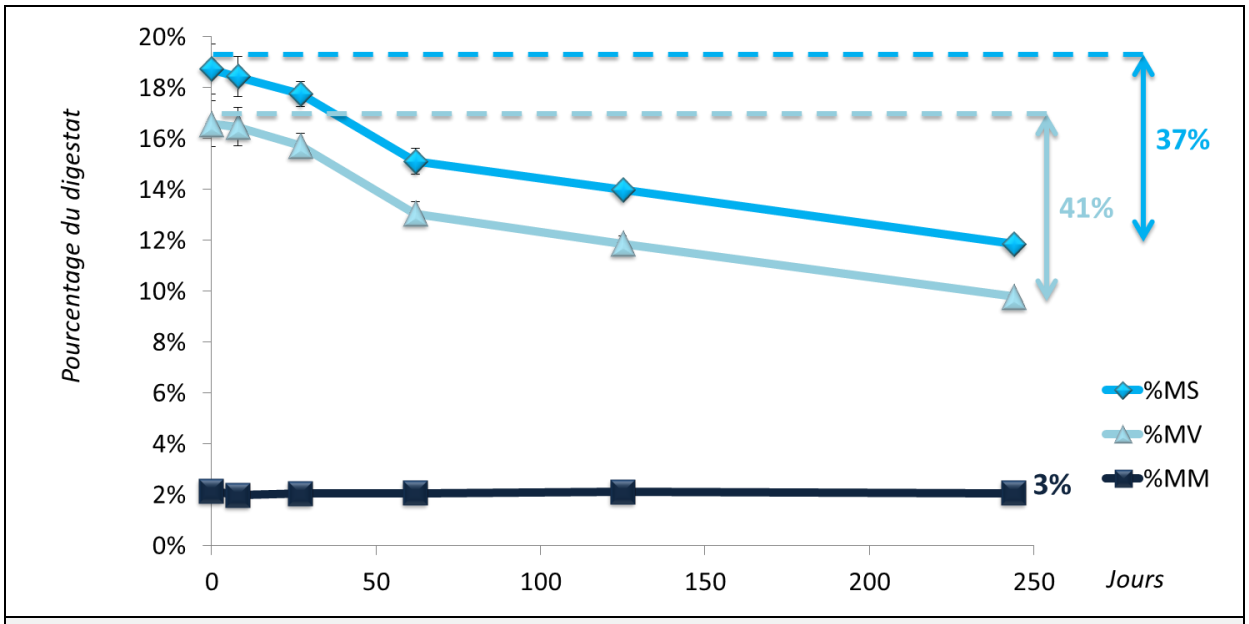


Figure 5-37 : Evolution des matières sèches, organiques et minérales du milieu.

Toutes ces observations indiquent que la première phase de la réaction présente un déséquilibre entre la fermentation et la méthanogenèse. Ceci conduit à une accumulation importante de métabolites augmentant le risque d'acidification du milieu. Dès lors que la méthanogenèse est initiée, les acides gras volatils accumulés dans le milieu, ainsi que ceux produits en continu durant cette période par l'hydrolyse du substrat, sont transformés progressivement en méthane et CO_2. Ceci conduit à une diminution des concentrations en métabolites, jusqu'à ce que l'hydrolyse devienne limitante. Ainsi, les six échantillons prélevés décrivent parfaitement la dynamique réactionnelle :

- Premier jour : mise en contact des micro-organismes avec le substrat.
- 8ème jour : fermentation des sucres solubles et adaptation des méthanogènes.
- 27ème jour : consommation des métabolites par les micro-organismes méthanogènes.
- 62ème jour : ralentissement de la réaction par une limitation en substrat facilement accessible.
- 125ème jour : ralentissement de la réaction par un très fort ralentissement de l'hydrolyse du substrat.
- 244ème jour : fin de la réaction.

5.3.3.2 Compartimentation des communautés microbiennes

Le protocole de compartimentation microbienne a été appliqué sur les digestats prélevés aux 8ème, 27ème, 62ème 125ème et 244ème jours. Ce protocole conduit à la préparation de trois compartiments : particulaire (> 30 µm), intermédiaire (de 3 µm à 30 µm) et soluble (< 3 µm). Ces échantillons sont comparés au milieu initial et au digestat final non compartimentés. L'ADN de ces échantillons a été extrait et analysé pour évaluer la structure des communautés microbiennes par CE-SSCP.

5.3.3.2.1 Compartimentation microbienne en fin de réaction

La Figure 5-38-b présente une comparaison brute des profils CE-SSCP basés sur le gène de l'ARNr 16S du milieu initial, du digestat final ainsi que des compartiments particulaire, intermédiaire et soluble en fin de réaction. Ainsi, il est possible de constater que le digestat en fin de réaction montre l'émergence d'un certain nombre de pics au détriment d'autres ayant disparus. La compartimentation microbienne montre également une spécialisation des communautés bactériennes. Par contre, une simplification importante du compartiment particulaire est observée. Cette analyse, également réalisée sur les *Archaea* (Figure 5-38-b), ne donne pas de différences significatives entre les profils.

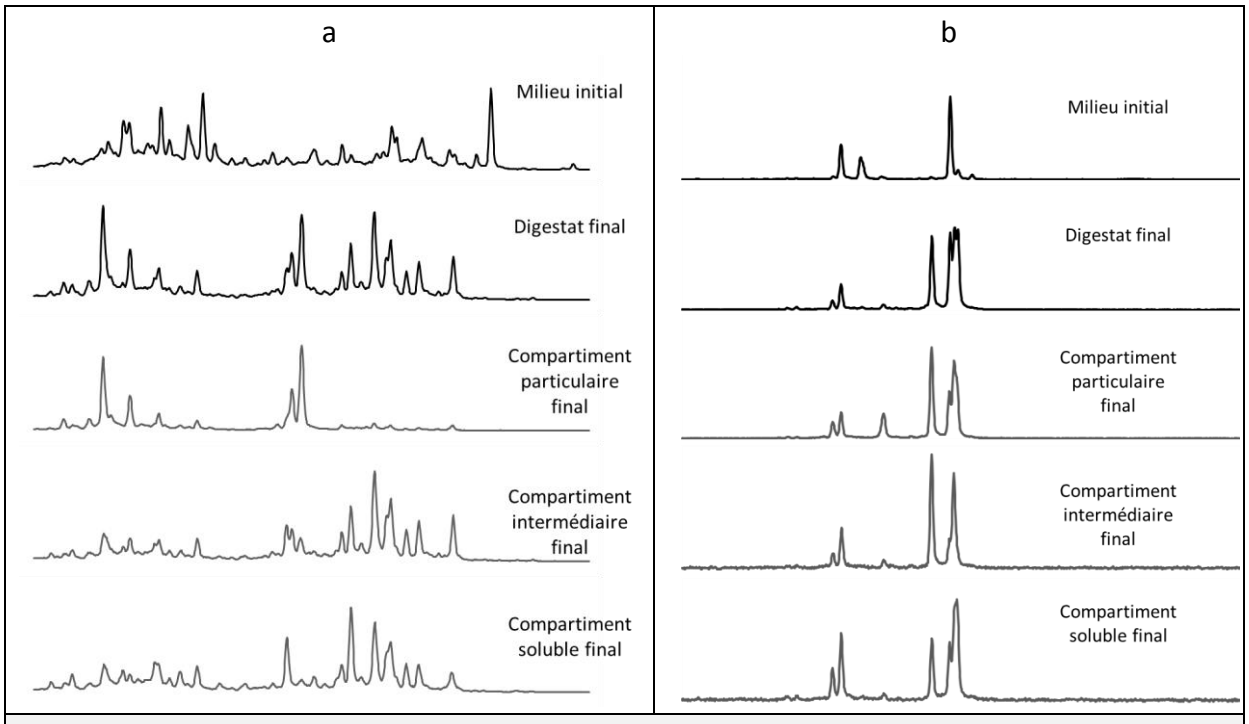


Figure 5-38 : Profils CE-SSCP des communautés microbiennes en fonction du compartiment et en comparaison des conditions initiales et finales du milieu.
(a) Bactéries. (b) *Archaea*.

Le nombre de pics des profils et l'indice de Simpson sont présentés dans le Tableau 5-21. Cet indice, tenant compte du nombre de pic et de leur abondance relative, est faible lorsque la diversité et la complexité du profil sont faibles (Quéméneur *et al.*, 2011). Ici, par rapport aux conditions initiales, une diminution du nombre de pics et une diminution limitée

de l'indice de Simpson sont constatées (Indice de Simpson de 4,5 à 4,1). Ainsi, malgré le faible taux d'inoculation, l'écosystème s'est spécialisé lors de la réaction tout en conservant toutefois une diversité bactérienne importante. Finalement, le compartiment particulaire, qui correspond toutefois aux micro-organismes associés aux particules ayant une taille supérieure à 30 µm, est le plus distinct parmi les échantillons. En effet, ce compartiment est caractérisé par une diversité plus faible que le compartiment soluble : 20 pics contre 26 et un indice de Simpson de 3,2 contre 4,2.

Echantillons	Nombre de pics	Indice de Simpson
Milieu initial	31±0	4,5±0,2
Digestat final	24±2	4,1±0,2
Compartiment particulaire	20±3	3,2±0,1
Compartiment intermédiaire	27±1	4,1±0,0
Compartiment soluble	26±0	4,2±0,2

Tableau 5-21 : Indicateurs de diversité microbienne en fin de réaction (244ème jour).

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour évaluer les distances entre les communautés bactériennes en fonction des compartiments auxquels elles sont associées par rapport aux conditions initiales (Figure 5-39-a). Chaque mesure contient deux réplicats correspondants aux deux digesteurs qui ont été suivis. La faible distance entre réplicats sur l'ACP démontre la bonne reproductibilité du protocole. A la fin de la réaction, le digestat et tous les compartiments ont divergés vis-à-vis des conditions initiales, confirmant l'effet de l'avancement de la réaction sur les communautés microbiennes de l'écosystème. Sur l'ACP dont les axes représentent 91% de la variance, le digestat brut se positionne entre les fractions soluble, intermédiaire et particulaire. Le protocole conduit donc à une compartimentation des communautés bactériennes, sans contaminations ou pertes d'ADN contenu dans l'échantillon.

Concernant la compartimentation, l'ACP met en évidence la spécificité du compartiment particulaire. Ceci s'ajoute à la diminution de l'indice de Simpson et du nombre de séquences majoritaires (Tableau 5-21). Lors de la dégradation, une spécialisation importante des micro-organismes au contact des parois végétales est donc démontrée. Ceci suppose que les bactéries du compartiment particulaire requièrent une structuration particulière du fait de la complexité du substrat. Il est donc probable que l'hydrolyse du substrat soit réalisée par les micro-organismes appartenant à ce compartiment (Martin, 2001).

Le compartiment intermédiaire, regroupant les particules dont la taille est comprise entre 3 et 30 µm, présente un profil, un nombre de pics et un indice de Simpson très semblables au compartiment soluble (particules < 3 µm) (Figure 5-38 et Tableau 5-21). Cette similarité se traduit sur l'ACP par une très forte proximité des compartiments intermédiaire et soluble. Par conséquent, ces deux fractions ne peuvent pas être considérées comme

différentes du point de vue du contenu bactérien. En l'état, le protocole de compartimentation semble donc surtout distinguer la fraction particulaire des fractions soluble et intermédiaire.

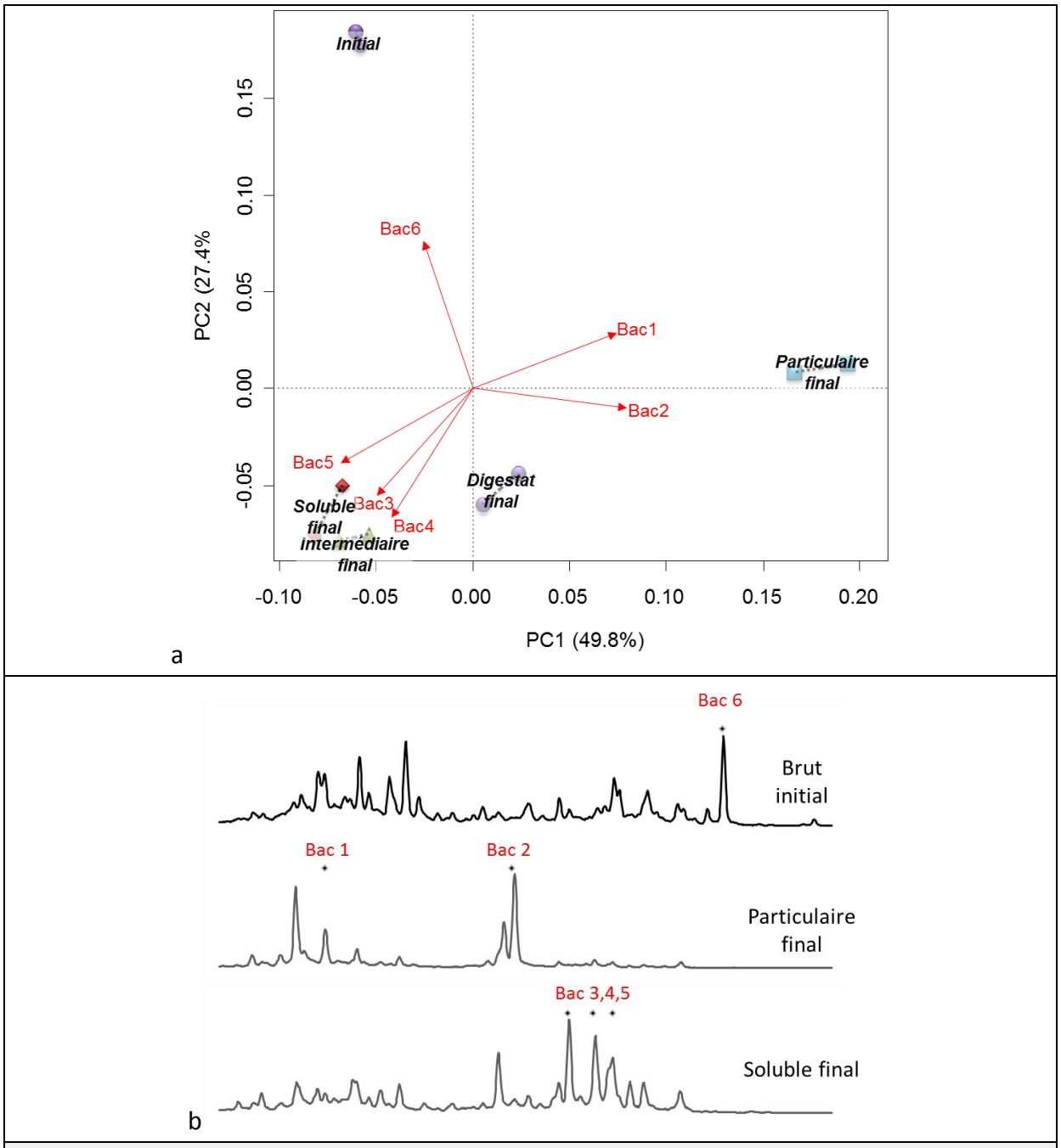


Figure 5-39 : Distinction des communautés bactériennes (16S) contenue dans les différents compartiments.
(a) Analyse en composantes principales en fonction de la compartimentation microbienne et du temps. (b) Structure finale des communautés microbienne et pics discriminants (représentés par des losanges).

La distinction des échantillons est réalisée à partir des profils. Il est alors possible d'identifier les pics discriminants les échantillons de manière significative. Ici, 6 pics correspondant à 6 séquences distinguent les conditions initiales, finales et les 3

compartiments (Figure 5-39-a). Les conditions initiales semblent principalement caractérisées par une séquence, nommée séquence bactérienne 6, qui est très abondante (Figure 5-39-a). Puisque le pic correspondant a disparu en fin de réaction, l'espèce associée à cette séquence d'ADN ne semble pas s'être adaptée aux conditions expérimentales ou au substrat (Figure 5-39-b). La distinction des compartiments est opérée sur 5 séquences bactériennes. Ainsi, deux séquences bactériennes (séquences bactériennes 1 et 2) semblent spécifiques au compartiment particulaire, tandis que trois autres (séquences bactériennes 3, 4 et 5) semblent corrélées avec la fraction soluble et intermédiaire. L'identification ultérieure de ces séquences pourrait permettent de caractériser les bactéries correspondantes. Grâce à leur description, il sera possible de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité hydrolytique est principalement associée au compartiment particulaire.

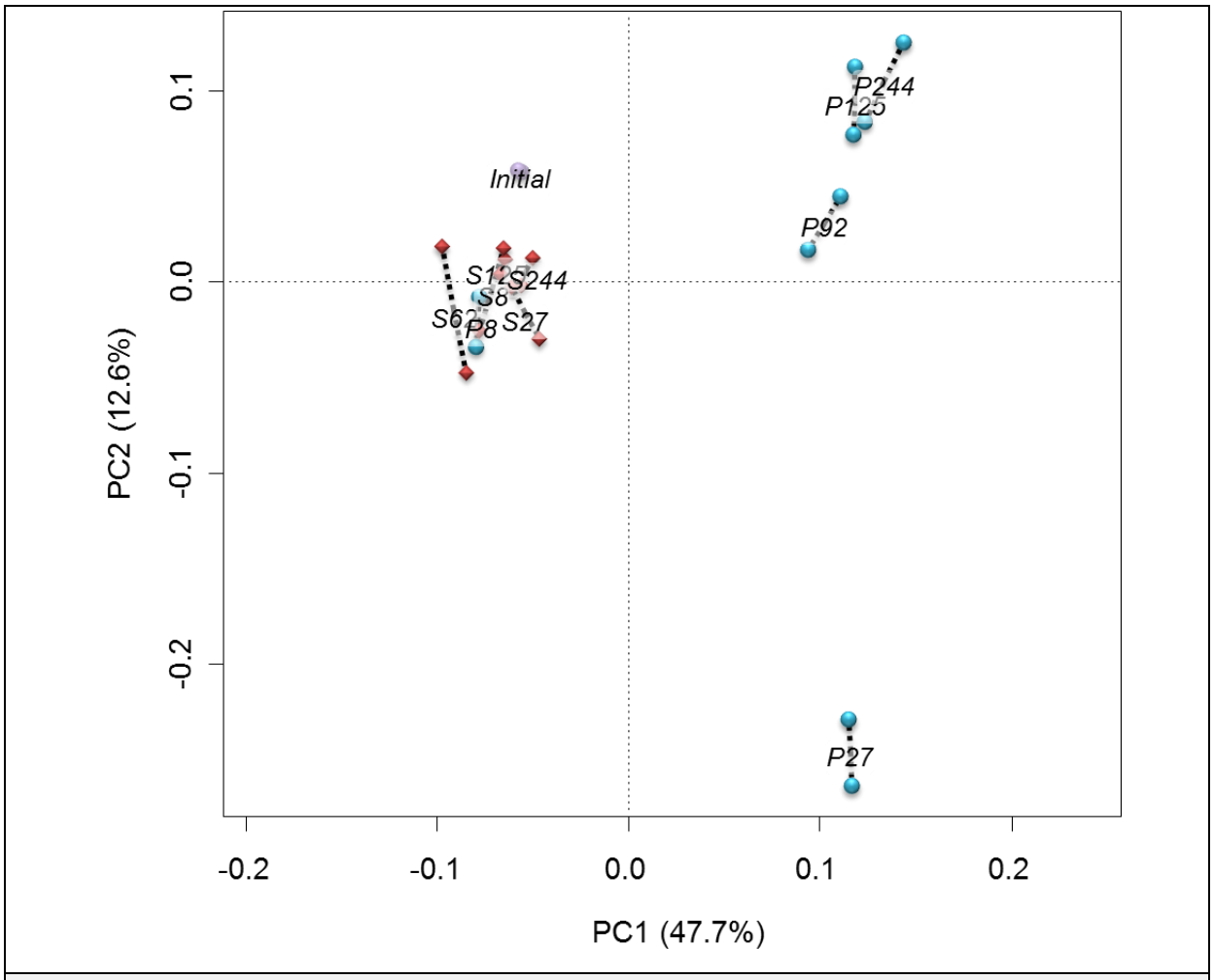


Figure 5-40 : Représentation sous forme d'analyse en composantes principales de la dynamique de compartimentation bactérienne (16S) des profils CE-SSCP.
(S) Compartiment soluble. (P) Compartiment particulaire.

5.3.3.2.2 Dynamique des communautés microbiennes

La dynamique des communautés microbiennes des compartiments est évaluée aux 6 dates de prélèvement. Une ACP a été effectué à partir des profils CE-SSCP des communautés

bactériennes (Figure 5-40). Selon cette représentation, la différentiation vis à vis de l'inoculum semble s'opérer dès les premiers jours de la réaction. Ainsi, le prélèvement au 8ème jour (prélèvement 1) montre une modification des communautés microbiennes vis à vis des conditions expérimentales. Cette modification est similaire pour les 3 compartiments suggérant l'émergence des mêmes communautés microbiennes dans ces environnements. Or, seul la fraction facilement accessibles, composée de sucres principalement (Sun, 2010), est dégradée à cette date. Il est alors possible de supposer que ce substrat est accessible quel que soit le compartiment microbien, ce qui ne génère pas une modification spatiale des communautés bactériennes. Après l'adaptation initiale observée au 8ème jour, le compartiment soluble présente une forte similarité tout au long de l'expérience. Cette faible variation des profils du compartiment soluble suggère une faible variation du substrat de ce compartiment et des conditions environnementales constantes au fil de la réaction. Au 27ème jour (prélèvement 2), les communautés bactériennes du compartiment particulaire se sont éloignées de celles présentes dans le compartiment soluble. Cette période correspond à la dégradation des parois végétales du parenchyme qui sont des tissus peu lignifiés (section 5.3.2). Par conséquent, l'émergence de certaines communautés bactériennes au contact des particules solides provient de la nécessité de dégrader un substrat plus complexe et présent sous forme solide. Au 62ème jour (prélèvement 3), une nouvelle modification des communautés du compartiment particulaire est observée. Cette date correspond au début de la dégradation des tissus ligneux (Figure 5-33, section 5.3.2). Ceci suggère une modification des communautés microbiennes en lien avec un changement d'accessibilité du substrat. La fin de la réaction (prélèvements du 125ème et 244ème jour) montre les mêmes tendances d'évolution des communautés propres à chaque compartiment que pour le point de prélèvement du jour 62. La forte spécialisation du compartiment particulaire au fur et à mesure de l'hydrolyse du substrat suggère que l'activité hydrolytique de la digestion anaérobie est réalisée par des micro-organismes adhérés aux particules solides qui évoluent selon les caractéristiques du substrat. L'évolution des profils du compartiment particulaire et les pics discriminants sont représentés sur la Figure 5-41. La distinction des profils au 27ème jour se traduit par l'émergence significative d'un pic supplémentaire, nommé séquence bactérienne 7 (p-value > 0.0001 ***). Ce pic est donc caractéristique de la dégradation des parois peu ligneuses, tandis que les séquences bactériennes 1 et 2 semblent caractéristiques des tissus ligneux. L'identification ultérieure des espèces associées à ces séquences, par pyroséquencage, est prévue afin notamment d'identifier les espèces responsables de l'hydrolyse des parois ligneuses. Les paramètres de procédés pourraient alors être conduits de façon à favoriser ces espèces dont l'activité est intéressante pour améliorer les performances du procédé.

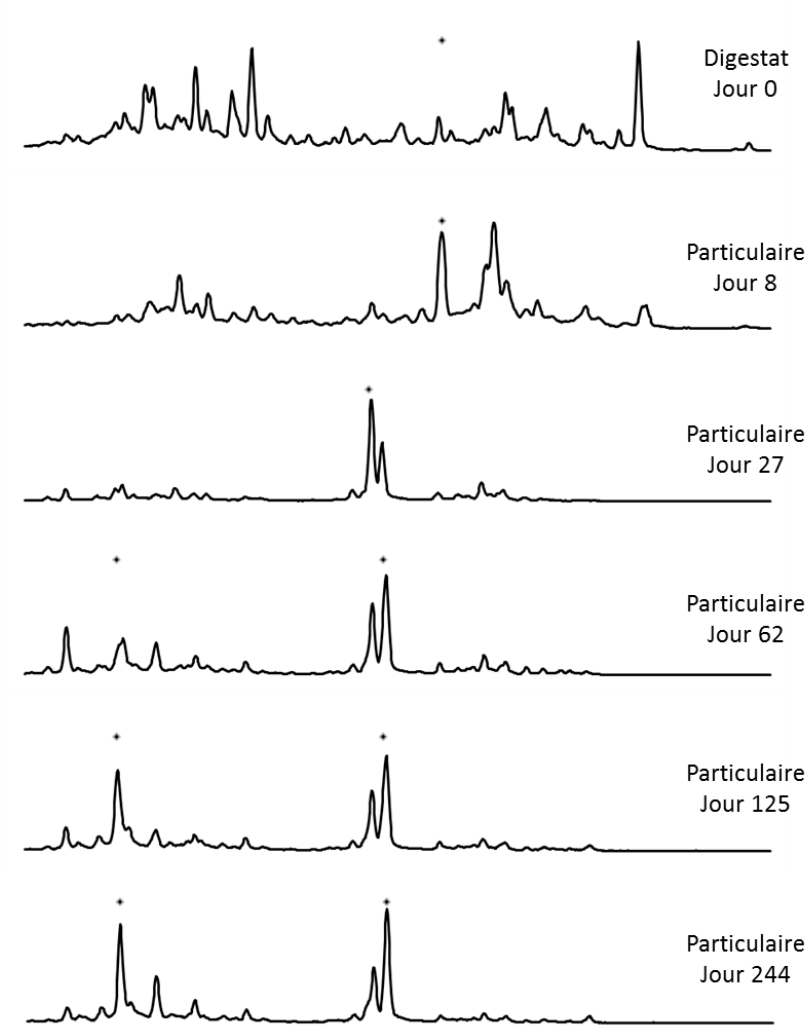


Figure 5-41 : Evolution des profils CE-SSCP des bactéries (16S) du compartiment particulaires.
Les losanges représentent les pics discriminant les profils.

Enfin, les profils CE-SSCP des *Archaea* indiquent un indice de Simpson compris entre 0.9 et 2.1, caractéristique d'une faible diversité. De plus, aucune corrélation ne semble reliée les *Archaea* aux compartiments ou à la dynamique réactionnelle. Par conséquent, seuls les communautés bactériennes se spécialisent et se compartimentent lors de la réaction. S'il n'y a pas de différences de localisation spécifique des *Archaea* dans le milieu, il n'est pas possible de conclure sur l'activité méthanogène. En effet, l'abondance relative en *Archaea* vis-à-vis des communautés bactériennes dans un même compartiment peut mettre en évidence la spécialisation fonctionnelle d'un compartiment. Cette notion d'abondance relative des populations microbiennes dans chaque compartiment doit être évaluée par des outils dédiés de quantification d'ADN (PCR quantitative, « polymerase chain reaction »). Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir trancher sur une éventuelle compartimentation de l'activité méthanogène dans le milieu.

5.3.3.3 Discussions du protocole de compartimentation

Dans la littérature, plusieurs protocoles ont été proposés pour étudier la spatialisation des micro-organismes en lien avec la dégradation du substrat (Zhang *et al.*, 2007b; Jensen *et al.*, 2008). Ces protocoles sont basés sur une séparation par centrifugation et font face à des problématiques analytiques limitant leur applicabilité : multiplicité des solutions tampons, dépendance au substrat, durée de la compartimentation, composition des compartiments. En ayant recours à la filtration, l'objectif est d'améliorer la répétabilité des séparations, d'avoir une meilleure définition des compartiments, d'être applicable à une large gamme d'échantillons et de réduire la durée de l'analyse.

Le protocole développé permet une compartimentation de la biomasse microbienne en fonction de la taille des particules solides auxquelles elle est éventuellement adhérée. Le choix des seuils de coupure des filtres a demandé une optimisation importante puisqu'il définit le contenu des compartiments, mais aussi la filtrabilité des échantillons. La fraction particulaire est fixée à 30 µm pour retenir la majorité des particules solides du digestat. Ce seuil de coupure a été choisi suite à une analyse granulométrique des digestats à l'aide d'un granulomètre laser. La phase soluble est issue d'une filtration à 3 µm afin de se rapprocher de la filtration à 2,7 µm retenue pour la caractérisation de la phase soluble durant cette thèse. Enfin, le filtre à 12 µm a été ajouté de manière pragmatique comme préfiltre pour éviter le colmatage du filtre à 3 µm.

Les résultats de cette expérience montrent qu'il est possible de compartimenter la biomasse microbienne associée aux particules solides (micro-organismes hydrolytiques) de celle associée à la phase soluble (micro-organismes « libres »). Cette étude semble indiquer que le compartiment particulaire est caractéristique de l'activité hydrolytique du substrat. Le compartiment soluble est plus stable et semble associé aux étapes ultérieures de la digestion anaérobie. Les résultats montrent également une bonne répétabilité du protocole par le suivi de deux digesteurs distincts sur une durée de plus 250 jours. De plus, la compartimentation n'induit pas de contaminations ou de pertes d'ADN lors sa réalisation. La méthode est donc satisfaisante mais présente quelques limites. Plusieurs pistes d'optimisations, exposées ci-dessous, peuvent être envisagées.

Le protocole de compartimentation semble qualitatif, et difficilement quantitatif. En effet, il est très difficile de connaitre la proportion de chaque compartiment car les faibles masses recueillies, d'humidités variables, ne permettent pas d'établir un bilan massique précis. Du point de vue de la biomasse microbienne, une PCR quantitative pourrait permettre de mesurer la quantité d'ADN contenu dans chaque compartiment. Cependant, la fraction particulaire n'est pas totalement récupérée et le bilan de matière ne pourrait pas être réalisé de façon précise. Ainsi, la nature qualitative des observations destine ce protocole à une exploitation comparative des résultats (typiquement pour le suivi dynamique d'un digesteur).

Il semble important de déterminer précisément le contenu des trois compartiments. Dans cet objectif, des observations microscopiques du contenu des compartiments, notamment par des techniques de marquage de l'ADN, telles que le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) ou le FISH (Hybridation in situ en fluorescence), pourraient être envisagées. De telles observations pourraient permettre d'ajuster le protocole (notamment les solutions tampons) pour améliorer la séparation. Ces solutions peuvent en effet agir sur la nature des polymères excrétés par les micro-organismes et donc sur leur adhésion au support (Goller & Romeo, 2008). L'évaluation de la répétabilité et de la fiabilité du protocole a été réalisée sur cette expérience. A ce jour, ce protocole est donc éprouvé uniquement sur les digestats produits durant la thèse : faible taux d'inoculation, résidu végétal et granulométrie de l'ordre du millimètre. Il reste donc à tester d'autres types de digestats qui peuvent différer soit par la nature du support (autres substrats lignocellulosiques, ordures ménagères, matériaux inertes) et/ou par la concentration en micro-organismes (cas des fumiers ou des digestats industriels). Les limites principales pour l'application du protocole restent : la filtrabilité des échantillons qui force l'ajustement de la quantité initiale d'échantillons, la durée de la filtration, le traitement des échantillons biologiques nécessairement réalisé à l'état frais.

5.3.4 DISCUSSIONS DU CHAPITRE 5.3

Suite aux résultats de ce chapitre, il est possible de proposer un modèle descriptif de la dynamique de dégradation des résidus lignocellulosiques en méthanisation sèche. Cette hypothèse descriptive est reprise dans la Figure 5-42 et développée à partir des résultats des performances des digesteurs, des observations microscopiques et de l'analyse des communautés microbiennes.

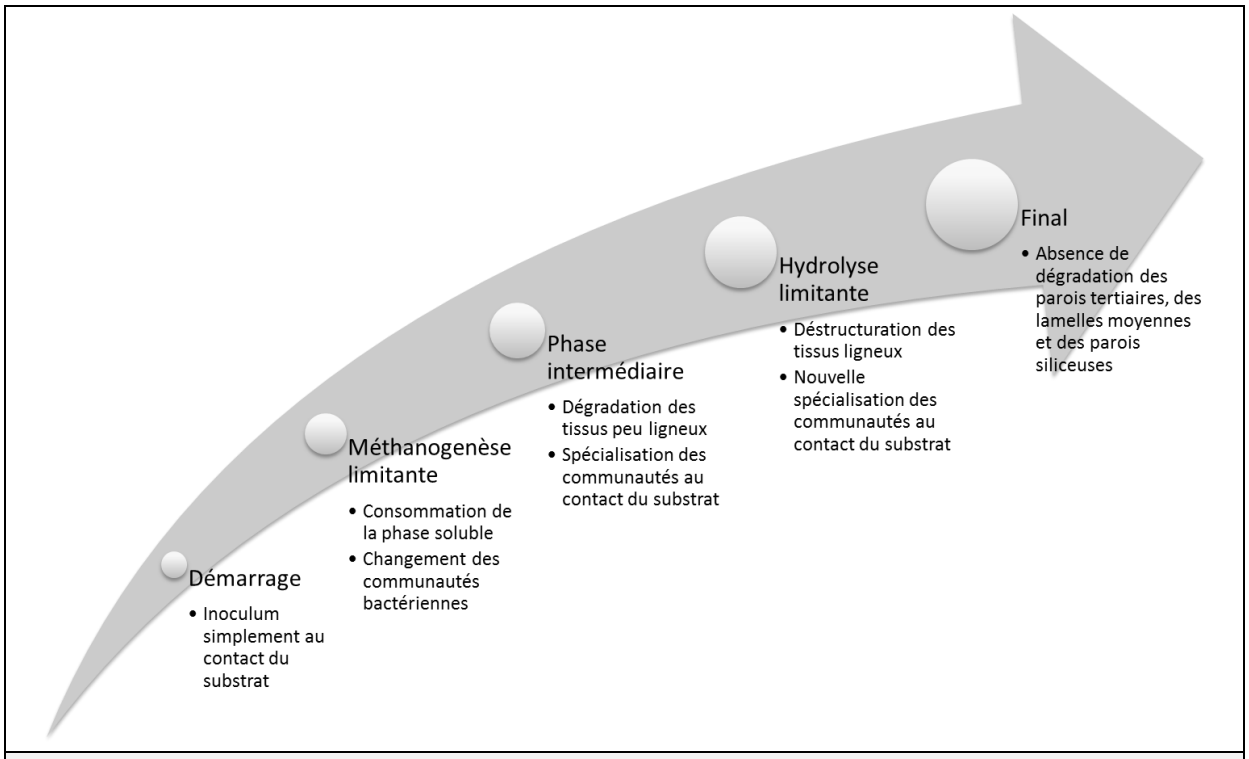


Figure 5-42 : Hypothèse descriptive de la dynamique de dégradation des résidus lignocellulosiques en digestion anaérobie par voie sèche.

5.3.4.1 Description de la dynamique de dégradation

Lors de la mise en contact de l'inoculum et du substrat, les micro-organismes sont mis en contact avec le substrat, leur positionnement initial étant aléatoire et dépendant de l'accessibilité des structures. Ainsi, puisque les cellules sont fermement accolées les unes aux autres, le positionnement des micro-organismes se fait principalement au niveau des vacuoles (Engels & Schuurmans, 1992). L'accès à ces structures cellulaires est permis soit par déchirures du tissu lignocellulosique (conséquence du broyage par exemple), soit par les ponctuations membranaires (Wilson & Mertens, 1995). La densité microbienne est donc statistiquement plus importante dans les cellules végétales offrant de plus larges vacuoles tels que les tissus peu ligneux du parenchyme. Les étroites vacuoles des tissus ligneux (sclérenchyme et épidermes) sont ainsi moins colonisées au démarrage de la réaction. La couche cireuse de l'épiderme (cuticule) limite également l'adhésion microbienne par les tissus externes de la paille (McAllister *et al.*, 1994), alors que cette zone représente un grande surface accessible.

La première phase de la dégradation consiste en la consommation de la phase soluble du substrat. Puisque l'hydrolyse est initialement plus rapide que la méthanogenèse (Shi *et al.*, 2013), une accumulation importante de métabolites apparait dans le milieu. Leur concentration, amplifiée par les faibles teneurs en eau, conduisent à une modification des communautés microbiennes. La phase soluble étant facilement accessible et métabolisable (Monlau *et al.*, 2012b), la dégradation des parois cellulaires est limitée. Par conséquent, les communautés microbiennes des différents compartiments sont proches les unes des autres. La différenciation des compartiments survient uniquement pour le compartiment particulaire lorsque la phase soluble est consommée et que la dégradation des parois débute. Cette spécialisation évolue en fonction de la disponibilité du substrat. Ainsi, une seconde phase correspond à la dégradation des tissus peu ligneux, tandis qu'une troisième phase, plus tardive, est liée à la dégradation des tissus ligneux (Akin & Burdick, 1975). Les micro-organismes se spécialisent pour hydrolyser les parois, et en priorité les parois primaires composées de cellulose et d'hémicelluloses. Ceci conduit à l'émergence de certaines espèces bactériennes dans le compartiment particulaire (Bac 7). Ce phénomène est sans doute accentué par les conditions sèches, puisque le déplacement des micro-organismes est limité. Les tissus lignifiés contiennent de la cellulose et des hémicelluloses mais leur accessibilité s'avère être diminuée par la présence de lignine. Ainsi, l'écosystème se modifie pour déstructurer ces tissus et libérer les sucres. La nature des sucres libérés tout au long de la réaction étant similaire, une quasi-absence de spécialisation du compartiment soluble est observée. Ceci suggère que la dégradation du substrat dans son ensemble est régie par l'hydrolyse, assurée par les micro-organismes du compartiment particulaire.

5.3.4.2 Conclusions sur l'expérience

Cette description des processus de dégradation des résidus lignocellulosiques en digestion sèche complète les observations de la littérature concernant la dynamique de dégradation par voie sèche (Shi *et al.*, 2013), les notions de compartimentation (Martin, 2001) et de spécialisation microbienne en voie sèche (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013). L'importance fondamentale de l'hydrolyse du substrat et du flux de métabolites qui en découle est ainsi au cœur de la dynamique réactionnelle et de la modification de la biomasse microbienne. Ce scénario est similaire à celui décrit dans les sols ou le rumen (Wilson & Mertens, 1995; Bertrand *et al.*, 2006). Il est également possible de mettre en lien ces résultats avec ceux du chapitre 5.2, où il a été montré que le comportement des micro-organismes est similaire en voie sèche (< 28% MS) et en voie humide. Ici, bien que les observations microscopiques aient été effectuées sur des entre-nœuds, l'extrapolation des informations sur l'ensemble des fractions constitutives de la paille est possible. En effet, feuilles, tiges ou épis sont composés de tissus peu lignifiés, de tissus de support lignifiés et d'épidermes, dont seule l'abondance varie en fonction des organes (Akin & Burdick, 1975).

En termes de performances de procédé, cette expérience a montré qu'il est possible d'obtenir des rendements élevés et proches du potentiel méthane du substrat. Ce résultat a

été obtenu après une durée de réaction particulièrement longue, conséquence du faible taux d'inoculation retenue. Or, dans la littérature, environ 30 jours sont classiquement accordés à la réaction (Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Cette durée relativement faible est sans doute la raison pour laquelle la déstructuration significative des tissus ligneux et de la fraction lignine des fibres n'a été que rarement décrite (Chanakya & Khuntia, 2013). En raison des barrières physiques limitant la dégradation de la paille (cuticule, parois tertiaire, accès aux vacuoles), il est probable qu'une durée de réaction longue soit nécessaire pour permettre la sélection des micro-organismes. Ceci est également vrai dans le cas de fortes inoculations. Dès lors, de nouvelles stratégies peuvent être imaginées pour se défaire de ces barrières physiques limitant l'hydrolyse:

- Prétraitements du substrat pour augmenter l'accès aux parois ligneuses (broyage fin, explosion à la vapeur).
- Prétraitements du substrat pour réduire la présence des cires, silices ou parois tertiaires.
- Ajustement des paramètres de procédé pour favoriser les communautés microbiennes responsables de la solubilisation des parois ligneuses.

5.3.5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5.3

Le suivi de deux digesteurs par voie sèche faiblement inoculés, sous l'angle de la dégradation microscopique du substrat et celui de la compartimentation microbienne, a permis de proposer un scenario explicatif de la dynamique de dégradation des résidus lignocellulosiques. Cette description précise fait écho aux modèles de dégradation de la lignocellulose dans d'autres écosystèmes, tels que le rumen ou le sol. Globalement, ce comportement ne semble pas être modifié par les conditions environnementales de la digestion sèche. L'étude montre que les micro-organismes se structurent pour dégrader successivement : la phase soluble, les tissus internes puis les tissus ligneux.

Cette étude à l'échelle microscopique peut avoir des répercussions fortes à l'échelle du procédé. En effet, la notion d'accessibilité du substrat et de la vacuole centrale en particulier a été clairement illustrée. Ainsi, trois obstacles physiques à la dégradation ont été identifiés : la cuticule cireuse réduisant l'adhésion sur tout l'épiderme du substrat, les tissus siliceux limitant la dégradation de l'épiderme et enfin la paroi tertiaire difficilement dégradable et diminuant l'accès aux parois ligneuses. Ces trois barrières sont de compositions très différentes et leur identification ouvre des perspectives vers de nouveaux prétraitements permettant d'augmenter significativement l'accessibilité du substrat : éclatement de la vacuole centrale (broyage), élimination des cires, destructuration des parois tertiaires et des lamelles moyennes (hémicelluloses).

La dégradation progressive de la matrice lignocellulosique est assurée par la biomasse microbienne qui se structure principalement en relation avec les caractéristiques du substrat à dégrader. Ainsi, la dégradation de la phase soluble du substrat, conduit à une première modification des communautés bactériennes. Lorsque l'hydrolyse du substrat débute, le changement de substrat conduit à un changement des communautés bactériennes associées à l'hydrolyse du substrat. Un tel changement se reproduit de nouveau lors de l'hydrolyse d'un substrat difficilement accessible : les tissus ligneux. Ainsi, il semble que seule l'hydrolyse du substrat soit concernée par la notion de compartimentation microbienne.

	Dynamique de biodégradation de la lignocellulose en digestion sèche	Structuration de la biomasse microbienne en digestion sèche
Message principal	✓ Biodégradation privilégiée de la phase soluble et des tissus peu lignifiés des pailles avant que la limitation en substrat ne conduise à la dégradation des tissus ligneux.	✓ Les communautés microbiennes associées au substrat se spécialisent fortement au cours de la réaction biologique.
Nouveautés	✓ Micro-organismes de la digestion anaérobie capables de déstructurer les tissus lignifiés. ✓ Dynamique de dégradation de la lignocellulose similaire en voie sèche et en voie humide. ✓ Parois tertiaires, cire et silices forment des barrières physiques à l'accessibilité du substrat. ✓ Attaques microbiennes similaires dans les sols, composts, rumens et en digestion anaérobie.	✓ Spécialisation des micro-organismes associés au substrat. ✓ Peu de modification du compartiment soluble. ✓ Peu d'impacts de l'acidification temporaire sur les profils des communautés bactériennes.
Confirmation de la littérature	✓ Dégradation préalable des tissus internes peu ligneux. (Bertrand *et al.*, 2006) ✓ Dégradation des cellules de l'intérieur vers l'extérieur en s'arrêtant à la lamelle moyenne. (Wilson & Mertens, 1995) ✓ La silice maintient l'ossature des cellules après dégradation. (Currie & Perry, 2007) ✓ La cuticule est une barrière physique à l'adhésion des micro-organismes. (McAllister *et al.*, 1994)	✓ Adaptation progressive des communautés bactériennes liée à l'avancement de la dégradation. (Shi *et al.*, 2013)
Hypothèses et perspectives	1) Attaque du substrat par l'épiderme grâce à un prétraitement dédié à l'élimination des cires (lipides) ou de la silice. 2) Prétraitements dédiés à l'augmentation de l'accessibilité du sclérenchyme. 3) Accélération de l'hydrolyse des parois secondaires par sélection des micro-organismes impliqués. 4) Optimisation du protocole de compartimentation par l'identification précise du contenu des compartiments. 5) Etude de la compartimentation sur des digestats de nature différente.	

Tableau 5-22 : Synthèse des résultats du chapitre 5.3.

5.4 MISE EN ÉVIDENCE DU FONCTIONNEMENT DYNAMIQUE DE LA DIGESTION SÈCHE

Ce chapitre vise à étudier l'effet de la réduction de la taille des particules sur la dynamique réactionnelle de la digestion sèche. Pour parvenir à cet objectif, la paille de blé a été broyée à trois tailles de particules puis dégradée dans des digesteurs discontinus durant 62 jours. Un taux d'inoculation plus important qu'au cours des manipulations présentées précédemment a été utilisé. La composition du milieu et les communautés microbiennes en présence ont été analysées grâce à des prélèvements effectués tout au long de la réaction. Cette expérience a permis de valider la description de la dynamique de dégradation des résidus lignocellulosiques exposée dans les chapitres précédents. Elle a également confirmé que des prétraitements, tels que les broyages fins, augmentent la part facilement accessible des substrats induisent une augmentation importante du risque d'acidification en digestion sèche mono-étape. Ce chapitre présente les principaux résultats sous la forme d'un article devant être soumis dans le journal « Bioresource Technology »

5.4.1 AVANT-PROPOS DU CHAPITRE 5.4

Les chapitres précédents ont montré que la dynamique réactionnelle, en digestion sèche, dépend fortement de l'accessibilité du substrat. Celui-ci présente trois niveaux d'accessibilité aux micro-organismes : phase soluble, tissus faiblement lignifiés et tissus ligneux (chapitre 5.3.2). La dégradation de la paille commence donc par la conversion de la phase soluble. Cette fraction de la paille est caractérisée par la matière organique extraite au détergeant neutre du protocole Van Soest, et est donc composée d'une grande abondance de sucres facilement accessibles. Ensuite, la dégradation se poursuit dans les tissus peu ligneux en raison de la composition relativement simple de ces parois (cellulose et hémicelluloses). La dégradation des tissus ligneux est plus tardive en raison d'une composition biochimique complexe, de la présence d'une paroi cellulaire faiblement dégradable (tertiaire) et enfin de la petite taille de la vacuole des cellules lignifiés. Or, les vacuoles des cellules végétales fournissent le principal angle d'attaque pour la biomasse microbienne (Wilson & Mertens, 1995).

Par conséquent, toutes les stratégies permettant d'augmenter l'accessibilité des structures cellulaires peuvent avoir un impact important sur la vitesse de dégradation. Pour cette raison, les prétraitements des substrats lignocellulosiques sont activement étudiés dans la littérature (Ren *et al.*, 2009; Barakat *et al.*, 2013; Monlau *et al.*, 2013). A la vue des résultats du chapitre précédent (5.3.2), les prétraitements permettant d'augmenter l'accessibilité du substrat, et de la vacuole centrale en particulier, sont à priori les plus efficaces. Le broyage semble particulièrement adapté puisqu'il permet d'éviter l'humidification du substrat. Or, pour fournir un accès à chaque vacuole, il est nécessaire de rechercher des broyages présentant un seuil de coupure inférieur à la longueur de la cellule végétale (Ssynthèse bibliographique). Puisque cette longueur peut être comprise entre 0,5 et 3 mm (Sun, 2010), les broyages à l'échelle du millimètre semblent capables de sectionner transversalement chaque cellule. Selon ce raisonnement, parmi les trois tailles de particules de cette étude, la fraction grossière (broyage à 10 mm) semble donc la moins adaptée. Ainsi, les broyages fins doivent être théoriquement recherchés, en tenant compte toutefois du coût énergétique comme limite économique (Barakat *et al.*, 2013).

Les résultats de la section 5.1.3 montrent que l'effet du broyage en voie sèche peut être fortement nuancé et qu'il existe aussi un optimum biologique au broyage. Cette étude a en effet démontré que pour de fines granulométries, le gain de production de méthane est pondéré par un fort risque d'acidification du milieu. Cette acidification s'explique par la très forte proportion de phase soluble des pailles finement broyées : ≈ 20% de la masse sèche contre 7% pour la fraction grossière. Le flux initial de métabolites qui en découle est donc plus important en conditions sèches et peut rapidement devenir inhibiteur des micro-organismes de la méthanogenèse. Il existe donc un optimum de granulométrie concernant la biologie du milieu. Or, cette production initiale peut être davantage tolérée par la biomasse microbienne si les acides organiques qui sont produits sont facilement assimilables (acide

acétique et butyrique) (Vavilin & Lokshina, 1996). La production d'acide propionique, doit être limitée, car il montre une plus forte résistance à la biodégradation (section 5.3.3). Puisque les conditions opératoires, telles que la teneur en eau, peuvent influencer le profil métabolique (section 5.2), il semble intéressant d'évaluer si celui-ci peut être modulé par la réduction de la taille des particules. La taille des particules possède également une forte interaction avec la teneur en eau du milieu (section 5.1.3). Or, un phénomène d'augmentation de la teneur en eau, survient au cours de la digestion anaérobie grâce à la dégradation des matières organiques (Shi *et al.*, 2013). Par conséquent l'humidification peut le risque d'acidification, la présence accrue d'eau favorisant la dilution des inhibiteurs, ce qui peut être en faveur de broyages fins. Une inoculation importante peut également être appliquée pour contrebalancer le flux de production de métabolites. Un optimum doit donc être trouvé entre la tolérance du milieu au flux de métabolites et le gain de performance à l'échelle du procédé. Puisque jusqu'à présent les expériences de cette thèse ont été réalisées avec des taux d'inoculation particulièrement faibles, une validation des mécanismes mis en jeu sous des conditions inoculations plus fortes est donc requise.

L'expérience décrite dans ce chapitre est donc conçue pour déterminer précisément l'effet de la taille des particules sur la digestion sèche, confirmer l'importance du flux initial de métabolites et valider le modèle dynamique de dégradation pour des taux d'inoculation différents de ceux testés précédemment. La dégradation de paille de blé broyée à trois granulométries différentes a été évaluée en digestion anaérobie par voie sèche. Ces digesteurs discontinus ont été inoculés avec un ratio S/X de 3 (en MV) qui est très inférieur aux ratios employés dans cette thèse (S/X > 15 en MV) mais qui correspond aux recommandations de la littérature (2 < S/X < 6 en MV) (Cui *et al.*, 2011; Brown, 2012; Liew *et al.*, 2012). En raison de la plus forte inoculation, les digesteurs (triplicats) ont été suivis pendant une durée plus courte de 60 jours (contre 250 jours lors des précédentes expériences). Des prélèvements réguliers ont été réalisés au cours de la réaction.

5.4.2 IS SUBSTRATE MILLING AN ADEQUATE PRETREATMENT FOR SOLID-STATE ANAEROBIC DIGESTION?

J-C. MOTTE, R. ESCUDIÉ, J. HAMELIN, N. BERNET, J-P. DELGENES, J-P. STEYER, C. DUMAS*

INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

** Corresponding author: claire.dumas@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 76*

5.4.2.1 Abstract

Performances of Solid-State Anaerobic Digestion (SS-AD) of raw lignocellulosic waste can be improved by substrate pretreatments. Particle size reduction can be adapted to dry biological processes, since it does not require water addition. However, the effect of milling on SS-AD dynamics is actually controverted. The aim of this study is to evaluate the effect of straw comminution on SS-AD degradation. Three particle sizes (milled at 10 mm, 1 mm and 0.25 mm) were selected and digested during 62 days. The medium was sampled 6 times during the biological reaction to be analyzed in terms of substrate degradation, production of metabolites and structure of microbial communities. The main results indicated that when methanogenesis is operational, particle size does not affect the process performances. However, a fine milling was not favorable for SS-AD, because of an acidification of the medium related to the soluble phase transformation into inhibitive metabolites. This study concludes that substrate soluble phase management is a key parameter to control in the start-up phase of SS-AD.

5.4.2.2 KeyWords

Dry anaerobic digestion dynamics; Particle size; Wheat straw; Microbial communities;

5.4.2.3 Highlights

- The dynamic of dry anaerobic digestion of wheat straw was precisely explained.
- Substrate milling increases the soluble phase and its degradation leads to a medium acidification.
- Soluble phase management is a key parameter for SS-AD start-up optimization.

5.4.2.4 Graphical abstract

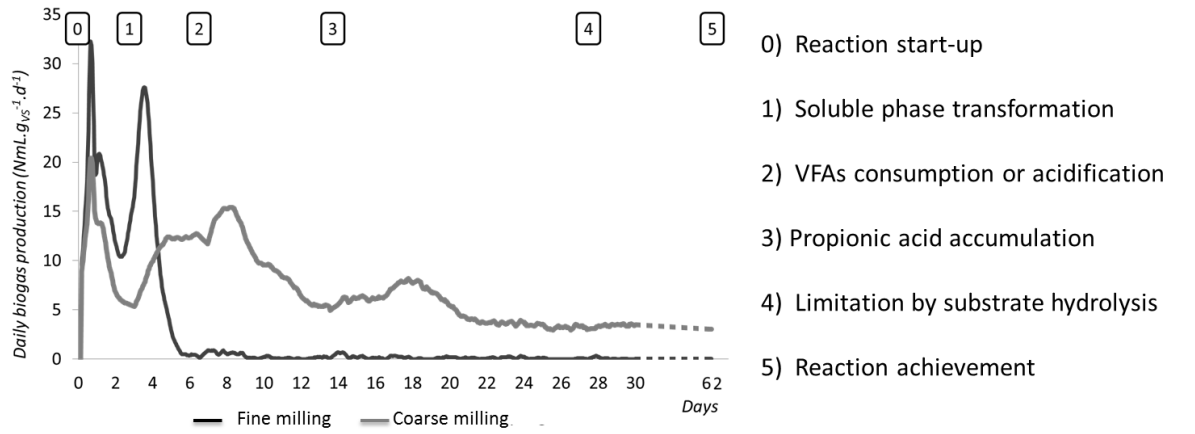


Figure 5-43 : Graphical abstract of the article untitled: “Is substrate milling an adequate pretreatment for solid-state anaerobic digestion?”.

5.4.2.5 Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a process developed at industrial scale for its ability to produce an energetic biogas, composed of methane and carbon dioxide, from organics matters considered as waste (Mata-Alvarez *et al.*, 2000). AD of solid wastes, such as the organic fraction of municipal solid wastes or the agricultural waste, requires water addition before its introduction into the process. The water content within the process is used to define two types of configuration: wet digestion with a Total Solid (TS) content below 15% and the Solid-State Anaerobic Digestion (SS-AD) with a TS content higher than 15% (Mata-Alvarez *et al.*, 2000). Generally, because of a lower water content, SS-AD operation is associated to an increase of the organic loading rate, a reduction of the specific reactor volume, a decrease of specific energy consumption for heating the process and a simplification of the final digestate dewatering step (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). These advantages conducted to the early development of dry processes at industrial scale, mainly based on scientific knowledge generalized from the wet AD and on empirical knowledge. Therefore, SS-AD is not fully optimized and the performances are generally lower than the wet AD (Le Hyaric *et al.*, 2012).

Among the solid wastes available for AD, the agricultural residues are attractive because of the co-production of a digestate rich in nutrients and holding agronomic qualities (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). Wheat straw is often used as a model of lignocellulosic residues, since its biochemical composition is intermediary between many agricultural waste (Vassilev *et al.*, 2012). These residues are constituted of biodegradable polymers, the cellulose and hemicelluloses, which accessibility and bioavailability are limited by their bounds with the lignin known as an undegradable polymer (Monlau *et al.*, 2013). Because of this complex structure, the limiting step of the lignocellulose degradation is generally the substrate hydrolysis (Philippidis & Smith, 1995). Therefore, many researches focused on the

pretreatment of the lignocellulosic substrates in order to improve their bioaccessibility (Monlau *et al.*, 2013). Among these pretreatments, milling seems appropriate for SS-AD since water addition and chemical compounds are not required (Barakat *et al.*, 2013). Furthermore, decreasing particle size conducts to an increase of substrate accessibility, a reduction of the cellulose crystallinity (undegradable form of the cellulose) and a significant increase of the soluble phase (Tamaki & Mazza, 2010; Barakat *et al.*, 2013). Therefore, in wet AD, the reduction of particle size improves the reaction kinetics and performances (Sharma *et al.*, 1988; Mshandete *et al.*, 2006).

In SS-AD, the effect of particle size reduction was rarely investigated and is still poorly understood. It was shown that milling affected indirectly the SS-AD according to an interaction with the TS content (Motte *et al.*, 2013). Since humidification of the medium occurs during SS-AD (Cui *et al.*, 2011), the effect of particle size could vary along the reaction progress. The influence of particle size on the reaction dynamics was enlightened by a higher risk of acidification during the first stage of the reaction (Motte *et al.*, 2013). In fact, a higher soluble phase of small particles (Tamaki & Mazza, 2010) can conduct to an important production metabolites, and its accumulation can inhibit the methanogenesis step. However, this observation was done on a low inoculated system using a substrate/inoculum ratio (S/X) higher than 15 in Volatile Solid (VS) basis, while a S/X of 3 is generally recommended at lab scale (Brown *et al.*, 2012; Liew *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). The medium acidification is attributed to an imbalance between hydrolysis/acidogenesis and methanogenesis rates. Therefore, the study of the microbial population could explain the negative effect of particle size on SS-AD.

The aim of this study is to understand how particle size reduction affects the SS-AD along the reaction progress. The reaction was evaluated dynamically by realizing six samplings at the beginning and during the reaction. In addition to the assessment of biogas production and degradation performances, these samples were analyzed in terms of metabolites accumulation and microbial communities distribution.

5.4.2.6 Material and methods

5.4.2.6.1 Dry anaerobic digestion implementation

5.4.2.6.1.1 Substrate preparation

Organic wheat straw (*Triticum aestivum*), harvested in summer 2010 in southern region of France (Hérault), was used as model substrate of lignocellulosic residues. The biochemical characteristics of this straw were previously presented in Motte *et al*. (2013). Three straw particle sizes were prepared by milling using a cutting miller (RETSCH® SM100) which grid determined the particle size: coarse fraction with a 10 mm grid, medium fraction with a 1 mm grid and fine fraction with a 0.25 mm grid. Because of technical limitations, the particle size of coarse and medium fractions was measured with an analytical sieve shaker,

while fine fraction was measured on a laser granulometer. Biomethane potential (BMP) of the straw was evaluate according to the protocol describe in Monlau *et al.* (2012b).

5.4.2.6.1.2 Experimental device

The SS-AD batch tests were carried out in reactors specifically design to allow sampling without headspace perturbation. Reactors of 2 L were set-up with 1 kg of media. The inoculum was the leachate of a municipal solid wastes digestate. The medium composition was calculated to obtain a S/X ratio of 3 (in VS basis) and an initial TS content of 22%. Therefore, the medium was composed of about 160 g of straw, 825 mL of diluted inoculum, 2.6 g of bicarbonate buffer and 1.5 g of NH_4Cl to adjust the C/N ratio at 40. After mixing, the initial pH of the medium was alkaline at 8.6±0.2. Because of the slight variations of moisture content between the three particle size, small variation of initial moisture content appeared (< 0.5% TS). In addition, a control reactor was performed using glucose as substrate to verify the inoculum activity. Two blanks, without substrate, were also prepared to estimate the contribution of the endogenous respiration. Reactor headspaces were flushed using nitrogen. Each condition was carried out in triplicate in a 35°C room during 62 days.

5.4.2.6.1.3 Biogas measurement

The biogas production was measured with volumetric gas counters (MilliGascounter, Ritter®) connected to each reactor. The online acquisition of the impulsion provided biogas profiles with a resolution of 3 minutes. Periodically, 200 µL of biogas was sampled and analyzed on a gas chromatograph (Perkin Elmer Clarus® 580). This instrument was composed of two capillary columns for the separation of: CO_2 on a Rt-Q-Bond (30 m length 0.32 mm diameter) capillary column and then H_2, O_2 N_2 and CH_4 on an Rt-Molsieve 5 Å (30 m length 0.32 mm diameter) capillary column. The biogas went from the injector (250°C) to the TCD detector (150°C) thanks to argon as carrier gas (350 kPa, 34 $mL.min^{-1}$).

5.4.2.6.2 Sampling management

Four samples, at day 0, 3, 7, 14, 28 and 62 (end of the reaction), were performed. Before and after sampling, headspace composition was measured to confirm the absence of perturbation. The choice of the sampling dates was done according to the reaction stage described in Motte *et al.* (2013) and evaluated by the biogas production profile.

5.4.2.6.2.1 Analytical methods

The TS content of each sample was measured after drying at 105°C during 48 h, followed by 3 h of calcination (550°C) for VS and ashes content determination. After digestate sampling, part of media was diluted at around 5% TS in order to extract the soluble phase. Immediately after dilution, the pH was measured. Then, the soluble phase extraction was performed by filtration using a glass filter (GF/D, Whatman). Metabolites (VFA, lactic acid and ethanol) were measured using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with a Biorad HPX column (35°C) with a 0.005 M H_2SO_4 water solution at

0.4 mL.min^{-1} as eluting solution. For better precision, VFA were analyzed on a gas chromatograph (Perkin Clarus® 580). The instrument was composed of an injector (250°C), a capillary column at 200°C (Elite-FFAP crossbond®carbowax®) and a FID detector (280°C). Nitrogen was used as carrier gas (6 mL.min^{-1}). Meanwhile, parts of the sample were frozen and freeze-dried for lignocellulosic structure evaluation. Fibers were analyzed, according to the Van Soest fractionation, on a raw fiber extractor (FIWE, VELP® Scientifica) (Soest, 1963). The soluble phase was measured by a hot water extraction (100°C during 30 min) before the classical NDF extraction (100°C during 1 hour). Finally, chemical oxygen demand (COD) of wheat straw was determined according to its elemental composition (Équation 40). This analysis was performed on an elemental analyzer Flash 2000 (ThermoFischer Scientific®). These results provide the composition of straw in term of carbon (C), hydrogen (H), oxygen (O), nitrogen (N) and sulfur (S).

$$C_nH_aO_b + \left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) O_2 \rightarrow nCO_2 + \frac{a}{2} H_2O \qquad \text{Équation 40}$$

5.4.2.6.2.2 Microbial communities analysis

The microbial communities of the digestate were evaluated according to their fingerprint profile. DNA extraction was performed according to the protocol present in Rousselon, *et al.* (2004). After extraction and purification, the protocol was the same as described in Abbassi-Guendouz *et al.* (2013): PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the 16S rRNA genes for bacteria and *Archaea* followed by CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand conformation polymorphism). CE-SSCP profiles were analyzed, according to the protocol of (Quéméneur *et al.*, 2011) using GeneScan software (Applied Biosystems) and the StatFingerprints R library (Michelland *et al.*, 2009).

5.4.2.6.3 Statistical analysis

The CE-SSCP fingerprinting profiles were studied by Principal Component Analysis (PCA) performed with R software (version 2.15.1; (Team, 2008)) using the *vegan* library. Variance analysis (ANOVA) were performed with R software (version 2.15.1; (Team, 2008)) using the Rcmdr library version 1.8.4. Levels of significance were: p-value < 0.0005 “***”, < 0.005 “**”, < 0.05 “*” and > 0.05 “ns”).

Straw fraction	Fine	Medium	Coarse	p-value
Mean particle size (mm)	0.11	0.67	1.45	Nd.
TS (%)[1]	93.6%±0.5	94.9%±1.3	93.4%±0.7	1.6e-2 *
VS (%)[2]	92.0%±0.9	91.7%±1.1	94.3%±0.4	1.7e-4 ***
Ash (%)[2]	8.0%±0.6	7.3%±0.3	7.1%±0.4	7.6e-5 ***
Water soluble fraction (%)	18.4%±4.4	5.6%±1.7	5.4%±1.6	4.4e-4 ***
Detergent soluble fraction (%)	9.0%±2.9	7.2%±2.6	5.0%±1.7	> 0.05 ns
Hemicelluloses (%)	28.3%±2.5	31.6%±2.3	32.0%±1.9	> 0.05 ns
Cellulose (%)	37.5%±2.6	49.9%±2.8	50.9%±1.9	9.5e-5 ***
Lignin (%)	6.9%±1.5	5.7%±1.3	6.6%±1.0	> 0.05 ns
Arabinose/xylose ratio	10.0%±1.5	8.4%±0.4	9.0%±0.8	> 0.05 ns

Tableau 5-23: Wheat straw characterization for the three fractions.
Percentages are expressed in volatile solids basis except: (1) percentage expressed in fresh matter and (2) percentage expressed in dry matter. Nd. for not determined level of significance

5.4.2.7 Results and Discussion

5.4.2.7.1 Substrate characterization

The characteristics of straw milled at three particle sizes are presented in Tableau 5-23. Statistical differences between theses fractions are stressed by a variance analysis (p-values). First, the mean particle size was 0.11, 0.67 and 1.45 mm respectively for fine (milled at 0.25 mm), medium (milled at 1 mm) and coarse fractions (milled at 10 mm). Strong differences between the grid mesh used for milling and the effective particle size are usually observed for fibrous materials because of the vertical crossing among the grids (Vaezi *et al.*, 2013). The three fractions showed statistical differences in terms of TS, VS and ashes contents (p-value < 0.05). However, these characteristics remained in a similar order of magnitude: 93 to 95% for TS, 91 to 95% for VS and 7 to 8% for ashes. Therefore, the differences can be attributed to storage condition or fraction preparation (Silva *et al.*, 2011). Van Soest fractionation was used to characterize each particle size in term of water soluble, detergent soluble, hemicelluloses, cellulose and lignin compartment. Among them, only water soluble and cellulose compartment of the three fractions statistically differed (p-value < 0.05). In particular, the soluble phase (sum of water and detergent soluble compartments) of fine milling fraction reached 27.4% against 12.9 and 10.4% for medium and coarse particles, respectively. This observation confirmed the increase of soluble phase, generally observed during fine milling (Tamaki & Mazza, 2010). Similarly, fine milling had also an impact on the decrease of cellulose fraction and on the structure of this polymer (reduction of cellulose crystallinity) (Barakat *et al.*, 2013). A similar arabinose/xylose ratio of around 9% (p-value > 0.05) indicated that the degree of substitution of the hemicelluloses

derivatives for every fraction was similar. This ratio was low compared to other lignocellulosic biomasses (Brown *et al.*, 2012), and suggested a good hemicelluloses digestibility (Bertrand *et al.*, 2006). Finally, elemental composition of straw indicated the following composition: 42.61% of carbon, 5.87% of hydrogen, 42.08% of oxygen, 0.39% of nitrogen and 0.05% of sulfur (mass percentage). This composition was classical compared to straws referenced in literature (Grotkjaer *et al.*, 2003) and provided a COD estimation of 1.19 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ (Équation 40). This value was used as reference to evaluate the yield of substrate degradability into methane and metabolites.

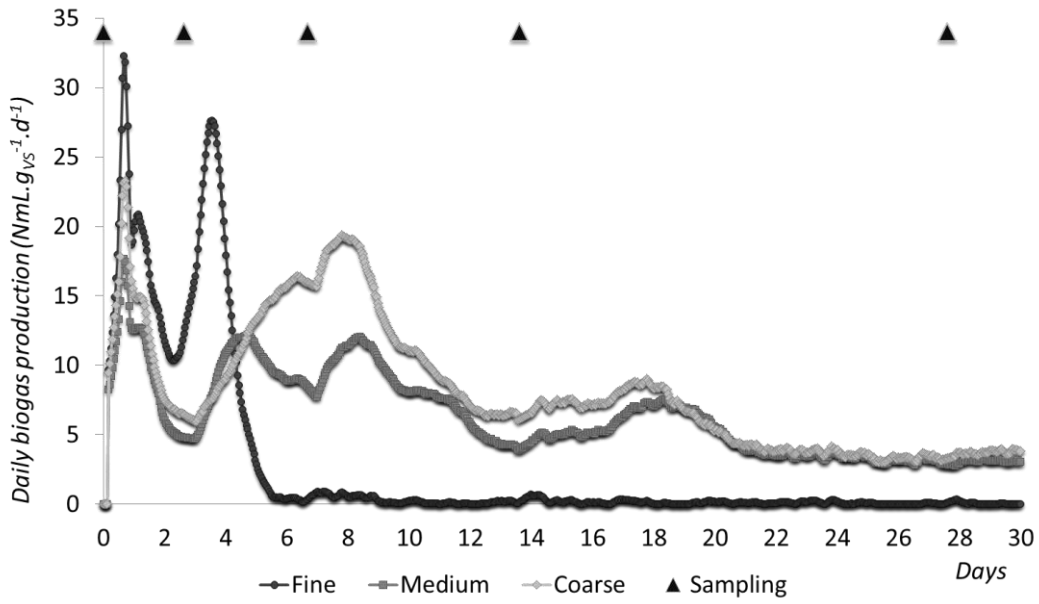


Figure 5-44: Daily biogas production rate for the three fractions.
Sampling dates are indicated as black triangles.

5.4.2.7.2 Process performances

5.4.2.7.2.1 Reaction dynamics

The process dynamics was evaluated from the biogas production measured every 3 minutes. In this purpose, the daily biogas production rate is presented in Figure 5-44 for the three particle size. During the first day, a peak of biogas production was observed for each condition. The maximal magnitude of this production rate appeared after about 1 day, and it was higher for small particles than for medium and coarse ones (32, vs. 18 and 23 NmL.g_{VS}^{-1}.d^{-1} respectively). During the second day, the production rate decreased rapidly for all the conditions. Figure 5-45 presents the variation of methane production rate, and the fractions presented a smaller peak of methane production rate during the two first days. The shoulder on the first peak of biogas was attributed to this first production of carbon dioxide (CO_2) only and then to methane (results of biogas composition). The biogas composition analysis showed a high proportion of CO_2 during this period (around 90% of the biogas produced at day 1). After the 3rd day, the biogas production rate increased again: a peak (27 NmL.g_{VS}^{-1}.d^{-1}) appeared on day 3 for the fine fraction), while it was on day 8 for the two

other fractions. If fine particles enhanced the biogas production, the latter suddenly stopped after 4 day of operation and never restarted. For the fine fraction, a same behavior occurred for methane production rate. The second peak of biogas production rate, observed from the 3rd day to the 12th day for both medium and coarse fractions, and presented less intense and its maximal magnitude appeared on the 8th day (12 and 19 $NmL.g_{VS}^{-1}.d^{-1}$, respectively). The maximal daily methane productions were 7 and 9 $NmL.g_{VS}^{-1}.d^{-1}$, for medium and coarse fractions. The date and intensity of the production were in agreement with other studies of the literature (Cui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012). A third peak of lower intensity appeared on the 15th day (7 and 9 $NmL.g_{VS}^{-1}.d^{-1}$ respectively), which corresponded to the third peaks of biogas production, and was associated to a strong decrease in CO_2 production (around 35% of the biogas produced at day 14). Finally, both total biogas and methane production decreased progressively and continuously, from the day 20 to the end of the experiment on the 62nd day.

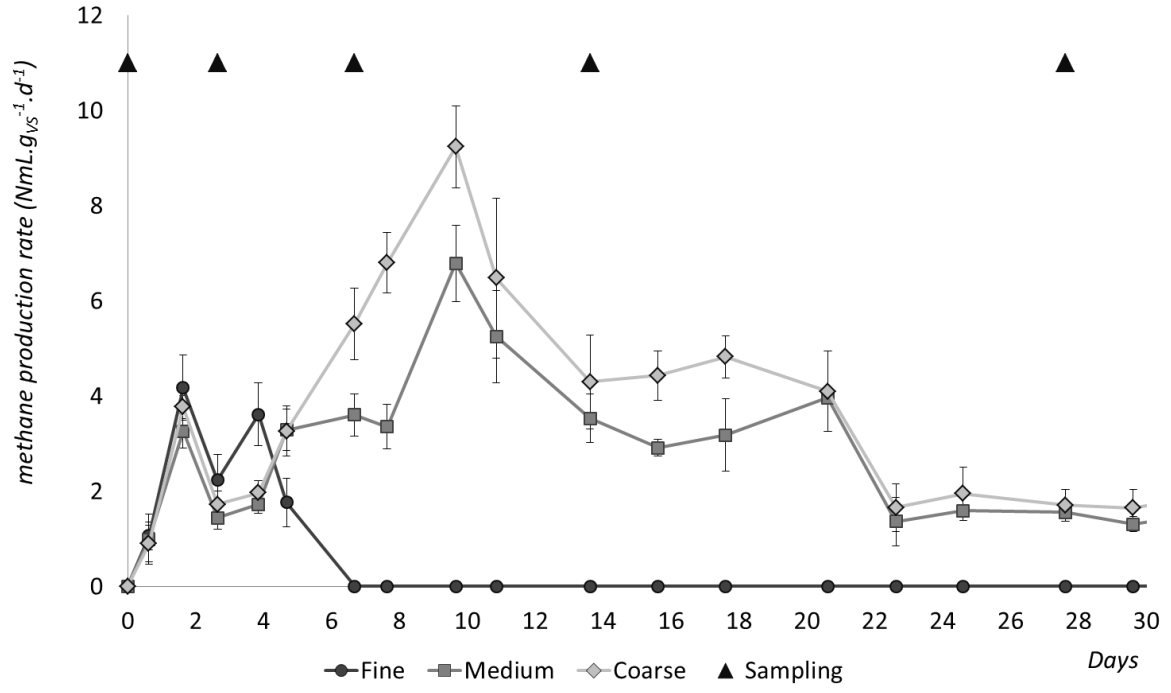


Figure 5-45: Effect of straw particle size on the SS-AD daily methane production. Samples dates are indicated as black triangles.

Therefore, the overall reaction dynamics was characterized by three phase of biogas production, which intensity and duration depend on the particle size. Particularly, two types of profiles can be distinguished: fine fraction with an initial rapid methane production interrupted suddenly after 4 days and both medium and coarse fractions with a slower methane production rate but continuous production until the end of the experiment.

Straw fraction	Fine	Medium	Coarse	p-value
Methane production ($NmL.g_{VS}^{-1}$)	13±3	168±6	192±25	4.5e-4 ***
Metabolite accumulation ($g.kg^{-1}$)	25.6±0.4	1.1±0.4	1.0±0.1	9.5e-11 ***
pH	5.5±0.1	8.2±0.1	8.4±0.1	3.2e-9 ***
Substrate conversion (%COD)	24.5%±0.7	36.1%±0.1	42.9%±5.2	8.8e-4 ***
Lignin+cellulose+hémicelluloses (% degradation)	14.3%±1.0	37.8%±0.7	34.6%±5.1	1.4e-4 ***

Tableau 5-24: Process performances for the three fractions at the end of the reaction.

5.4.2.7.2.2 Final process performances

The final process performances (62 days of reaction) are presented in Tableau 5-24 for the three particle sizes. Five parameters are presented as representatives of the digesters performances: cumulated methane production, concentration of metabolites, pH, substrate conversion and lignocellulose degradation. First, coarse milling presented the highest methane production (192±25 $NmL.g_{VS}^{-1}$) with performances that reached more than 85% of the biomethane potential of the straw (220±16 $NmL.g_{VS}^{-1}$). This relatively high methane production in comparison with literature (Brown *et al.*, 2012) was associated to a substrate conversion of 43% (ratio of the converted COD on the theoretical COD of the straw), which corresponded to the straw biodegradability. This biodegradation was associated to a degradation of 34.6% of the parietal residues of lignocellulose (solid residue after neutral detergent extraction during Van Soest analysis), and to the soluble phase degradation, which represented around 12% of the straw. Meanwhile, the medium fraction, which showed similar biogas production profiles, presented a lower methane production of 168±6 $NmL.g_{VS}^{-1}$ and a smaller substrate conversion of 36.1%. Finally, the fine fraction presented a very small methane production (only 13±3 $NmL.g_{VS}^{-1}$), induced by the reaction stop after the 8 days of operation. This bioreaction interruption was attributed to a medium acidification as observed previously in literature (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012).

The acidification of fine fraction was confirmed by a low pH (5.5) and a final VFA accumulation of around 26 $g.kg^{-1}$. In comparison, a final pH of 8.4 and a concentration of VFA of 1 $g.kg^{-1}$ were measured in the medium and coarse fractions. The initial accumulation of metabolites can be a consequence of the transformation of easy available compounds contained in the soluble phase (Monlau *et al.*, 2012b; Shi *et al.*, 2013) 24% of the substrate COD was converted mainly in VFA. Since 14.3% of the lignocellulose was degraded, COD produced came from both soluble phase and substrate hydrolysis. This confirmed that small particle size improve substrate hydrolysis rate (Barakat *et al.*, 2013). Furthermore, the literature on wet anaerobic digestion generally indicated higher performances (kinetics and methane production) for smaller particle size (Sharma *et al.*, 1988; Mshandete *et al.*, 2006). However, in dry digestion, it was previously observed that fine milling increased the risk of

acidification for a small effect on maximal methane potential (Motte *et al.*, 2013). Therefore, the decrease of performances for smaller particle size seems specific to SS-AD.

Particles size	Sampling number/date	Methane ($g_{COD}.g_{TS}^{-1}$)	VFA ($g_{COD}.g_{TS}^{-1}$)	Substrate conversion (%COD)	pH	TS content (%)
Fine	day 0	0±0	5±1	0±0	8.4±0.0	21±0
	day 3	18±3	70±3	10±0	7.4±0.1	21±0
	day 7	32±6	140±10	18±1	5.5±0.0	20±0
	day 14	34±7	154±29	20±2	5.5±0.0	20±0
	day 28	33±4	175±4	23±2	5.4±0.0	21±1
	day 62	40±8	207±2	25±1	5.5±0.1	19±0
Medium	day 0	0±0	4±1	0±0	8.7±0.1	21±0
	day 3	14±1	47±4	7±0	8.4±0.1	22±0
	day 7	42±4	70±3	13±0	7.6±0.0	21±0
	day 14	120±14	45±4	19±2	8.6±0.1	21±1
	day 28	205±10	5±3	23±1	8.8±0.0	20±0
	day 62	400±5	8±4	36±0	8.2±0.1	16±0
Coarse	day 0	0±0	3±1	0±0	8.6±0.1	22±0
	day 3	15±2	43±2	7±0	8.4±0.0	22±0
	day 7	55±7	64±9	13±2	8.1±0.1	20±0
	day 14	167±24	43±9	23±4	8.7±0.1	20±0
	day 28	270±41	4±1	29±4	8.9±0.1	19±1
	day 62	462±57	7±1	43±5	8.4±0.1	17±1

Tableau 5-25: Characteristics of the samples during the reaction progress for the three particles size.

5.4.2.7.3 Evolution of medium composition

Six samplings were performed all along the experiment (days 0, 3, 7, 14, 28, 62). These dates permits to follow the reaction dynamics according to the biogas production profile (Figure 5-44) (Motte *et al.*, 2013). Tableau 5-25 presents the process performances (methane production, VFA, substrate conversion) and medium analysis (pH, TS content) at these dates.

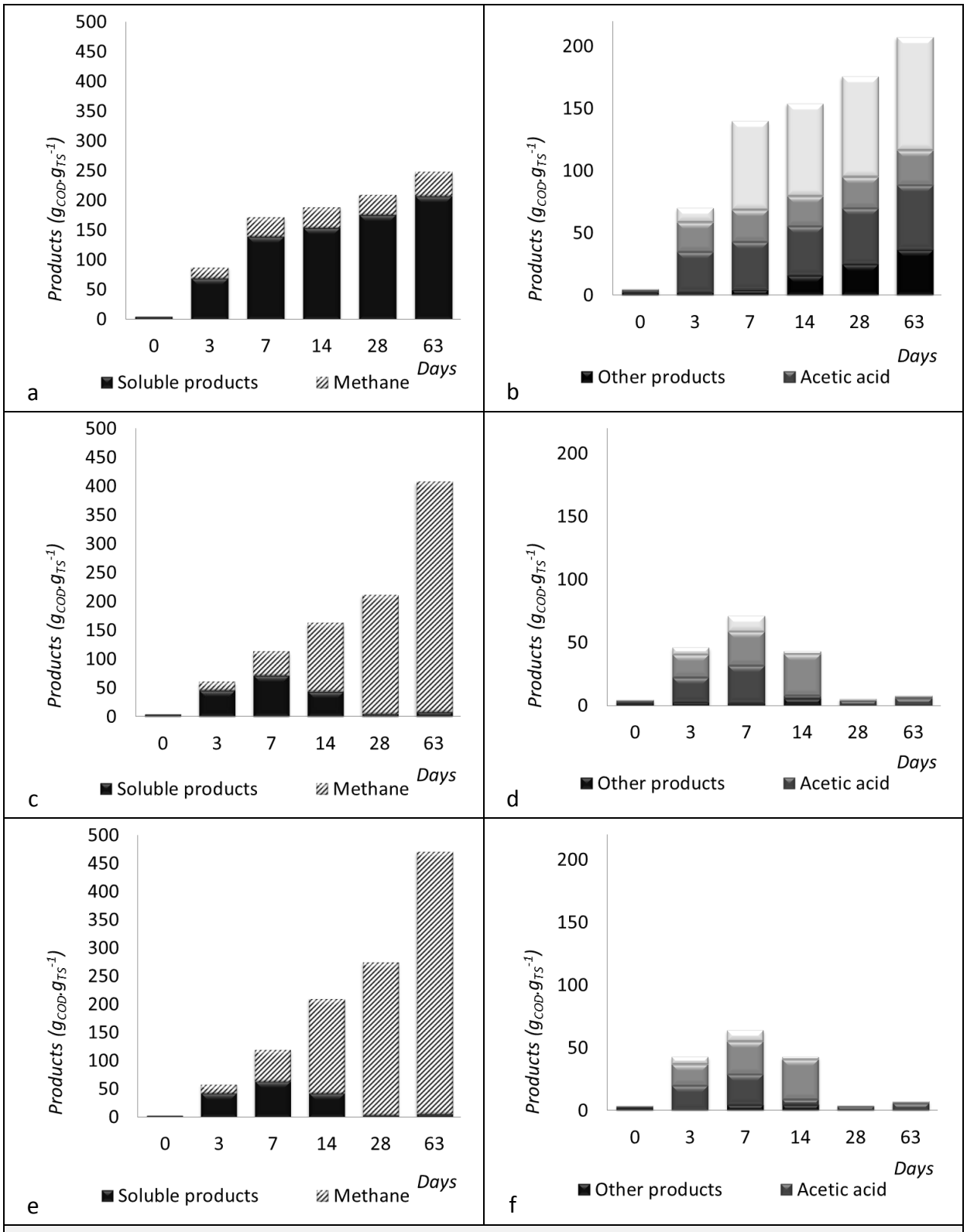


Figure 5-46: Dynamic evolution of fermentative products for the three particles sizes. (a) Metabolites production for fine fraction. (b) Soluble metabolites profiles for fine fraction. (c) Metabolites production for medium fraction. (d) Soluble metabolites profiles for medium fraction. (e) Metabolites production for coarse fraction. (f) Soluble metabolites profiles for coarse fraction.

First, for efficient AD conditions (*i.e.*, medium and coarse fractions) the substrate conversion was progressive during the experiments (Figure 5-46-c and Figure 5-46-d). Even if the biogas production presented several peaks of production, the substrate conversion was more progressive. On day 3 (just after the first peak of biogas production), VFA production reached about 9 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ and the methane production about 3 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$. Since 7% of the substrate was transformed during this period, this initial production can be related to the degradation of the soluble phase, which was the more accessible fraction of the substrate (Buffière *et al.*, 2008; Monlau *et al.*, 2012b). On day 7 (maximal methane production peak), a higher concentration of VFA was observed (13.8 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ and 11.9 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ for the medium and coarse fractions, respectively), related to a slight decrease of pH (7.6 and 8.1, respectively). Meanwhile, the methane production was in progress since its production reached 8.3 and 10.3 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ for medium and coarse fraction, respectively. Despite the high VFA concentration, the absence of methanogenesis inhibition was attributed to the alkaline pH, which favored the dissociated forms of VFA and reduced their inhibition potential (Amani *et al.*, 2010). The metabolite distribution, presented in Figure 5-46-d and Figure 5-46-f, indicated that the three main compounds produced by the reaction were acetic, propionic and butyric acids, as usually observed in the literature (Staley *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). On day 14 (*i.e.*, end of the maximal peak of methane production), half of the methane was produced and around 20% of the substrate were converted. This period was related to a decrease of metabolites concentration down to 8 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ for both fractions. Figure 5-46-d and Figure 5-46-f show a strong accumulation of propionic acid, which is known to be hardly degradable in AD (Vavilin & Lokshina, 1996; Li *et al.*, 2012). The overall VFA degradation was achieved on day 28 (residual concentration < 1 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$). As a consequence, from days 12 to 20, the methane production was associated to the degradation of propionic acid by microorganisms which needed longer time to activate adequate degradation activity (Vavilin & Lokshina, 1996; Li *et al.*, 2012). At the end of the experiment (day 62), a low residual metabolites concentration and a regular low methane production were reported, suggesting that the produced VFA were immediately transformed into biogas, and therefore that substrate hydrolysis was the limiting factor of the reaction. Finally, during the experiment, the TS content of the media decreased of about 25% as previously indicated in the literature (Shi *et al.*, 2013). The progressive increase of water content during the substrate degradation was able to increase the inhibitors dilution, improve the mass transfer or substrate accessibility (Pommier *et al.*, 2007; Staley *et al.*, 2011; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012).

The acidified condition (*i.e.*, the fine fraction) showed a similar methane production (3.7 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$) than the medium and coarse fraction (3.0 and 3.3 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ respectively) after 3 days of experiments. Therefore, the methane production could not be an early indicator of the media acidification. Meanwhile, a high VFA accumulation (15 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$) was observed, leading to a slight decrease of pH (7.4). On day 3, the VFA distribution (Figure 5-46-b) was similar to the previously described fractions with a high abundance of acetic, propionic and butyric acids. On day 7, the abundance of butyric acid was higher than in the case of efficient

conditions. However, the butyric accumulation was not as high as straw fermentative processes where a butyric/acetic acid molar ratio of 1.5 is generally observed (ratio of 0.7 for fine fraction) (Guo *et al.*, 2010). In addition, the accumulation of valeric acid (3.5 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$) appeared on day 7. From the day 7 and to the end of the experiment, the medium presented a similar composition as described previously at day 62 with an acid pH around 5.5, a high VFA accumulation higher than 25 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ and the absence of methane production. Meanwhile, the substrate conversion increased slowly because of the production of other metabolites, such as ethanol, valeric and caproic acid. Therefore, the production of such metabolites could be an indicator to anticipate the medium acidification.

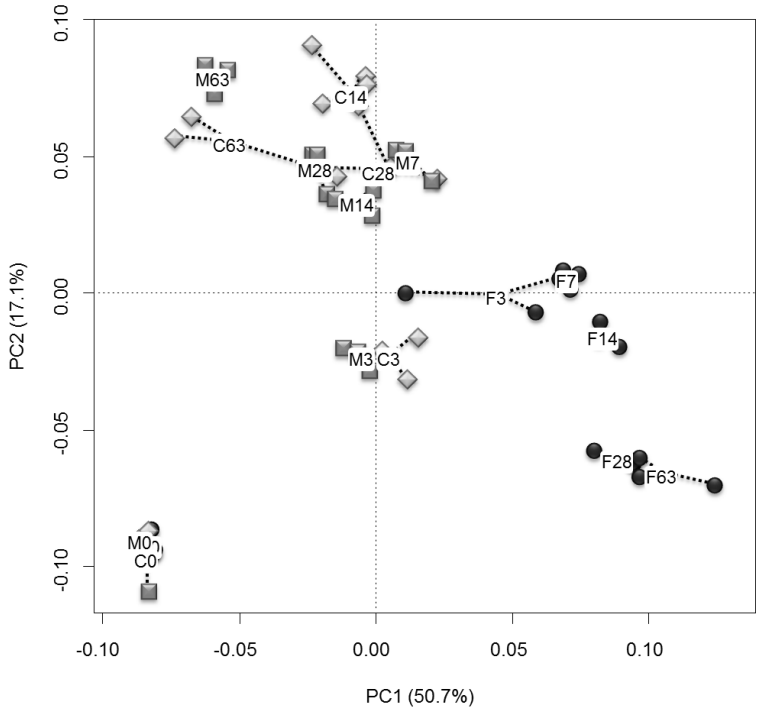


Figure 5-47: Principal Component Analysis (PCA) of bacterial communities CE-SSCP profiles including discriminant peaks.

Circles represent the Fine fraction (F). Squares represent the medium fraction (M). Diamonds represent the Coarse fraction (C).

5.4.2.7.4 Microbial communities structuration

The three conditions tested conducted to two types of process behavior. In fine particle reactors, an acidification of medium occurred on day 7 and it was attributed to a fast soluble substrates conversion into VFA. Meanwhile, the medium and coarse fractions presented similar quantities of metabolites, which were successfully degraded inducing a high substrate conversion. To understand if the different steps of the biological degradation are correlated to a change of metabolic activity or microbial population, the structure of microbial communities was analyzed. A principal component analysis (PCA) (Figure 5-47) was performed on Euclidean distances between bacterial communities during the reaction progress for the three conditions. Because three replicates were done for every condition, 3

points are represented for every condition and dates. Meanwhile, the two first PCA axes explained 67.8% of the variance. Just after inoculation, on day 0, the microbial structures of the three conditions were similar. A strong modification of bacterial adaptation was observed for all the conditions after only 3 days. Then, profiles modifications occurred progressively according to the reaction progress. Globally, medium and coarse fraction CE-SSCP profiles were similar all among the reaction progress. However, the fine fraction diverged from efficient conditions after only 3 days. This distinction was related to the higher accumulation of VFA at this time. This separation between efficient and inefficient conditions was more important and definitive at day 7. Therefore, the modification of microbial community occurs rapidly in the process and allow to distinct efficient and inefficient conditions.

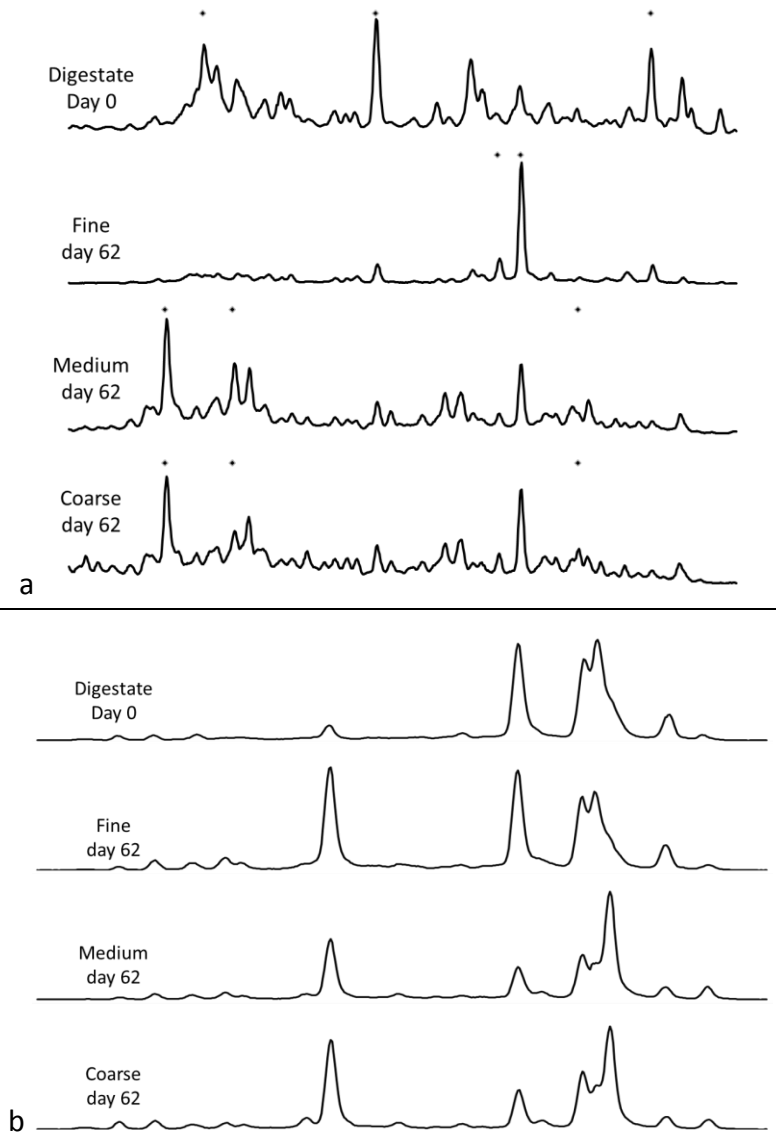


Figure 5-48: Initial and final bacterial (16S) CE-SSCP profiles with the corresponding discriminant peaks.
(a) Bacterial communities. (b) *Archaea* community.

The bacterial SSCP profiles (Figure 5-48-a) of initial conditions were distinguished by two main peaks that decreased drastically after the startup of the reaction. Meanwhile, efficient conditions were characterized by three abundant bacterial species, while two others were related to acidified conditions. The fine fraction profiles were characterized by a quite low Simpson diversity index of 3.2, compared to the efficient condition with a Simpson diversity index of 4.8.

The *Archaea* community structures were also evaluated (Figure 5-48-b). Analysis based on PCA did not indicated significant differences between milling conditions and during the reaction progress. Their respective profiles, do not show any simplification of the *Archaea* community of efficient or inefficient conditions: Simpson diversity index was between 2.1 and 2.4 for every condition. Therefore, at day 3, the failure of the fine fraction AD could be anticipated by a specific bacterial signature, which was different with medium and coarse particle size, but not by *Archaea* signature. Therefore, the early bacterial community analysis could allow anticipating AD failure. The use of the microbial signature as indicator of SS-AD failure was a concept proposed previously in the literature (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013).

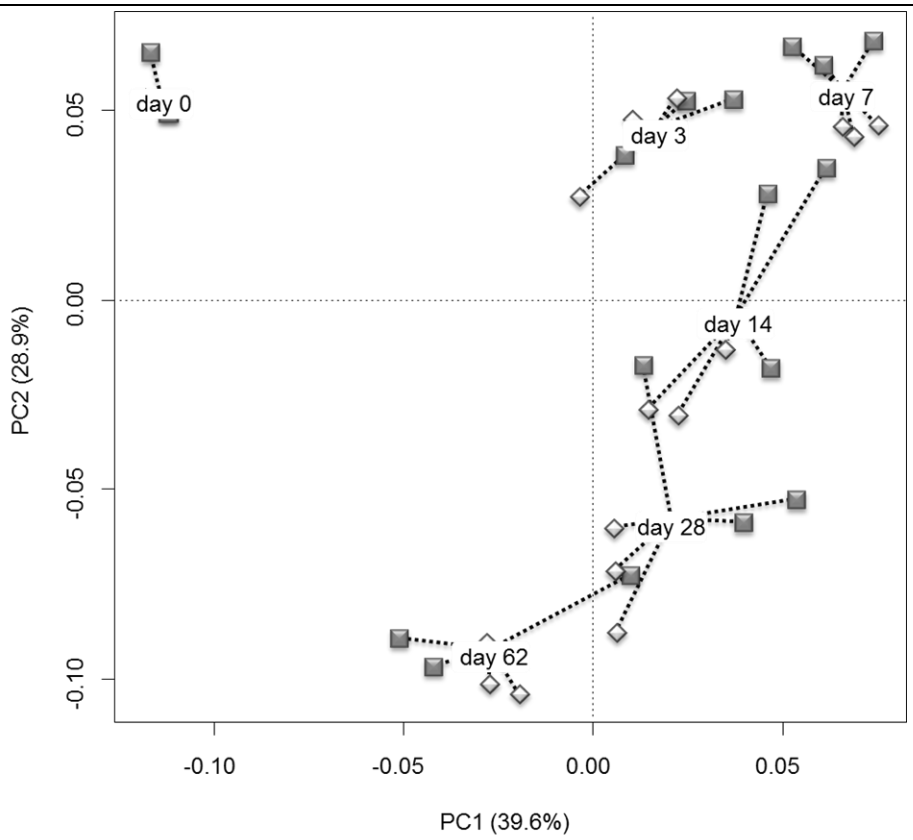


Figure 5-49: Principal Component Analysis (PCA) of bacterial communities as CE-SSCP profiles: zoom on efficient conditions (medium and coarse fraction).
Squares represent the medium fraction. Diamonds represent the Coarse fraction.

The dynamical change of bacterial community structure during efficient biodegradation (*i.e.* medium and coarse fractions) is presented on Figure 5-49. The two first axes of the PCA analysis represented 68.4% of the variance and demonstrated a strong change of the bacterial community structure with the reaction progress. If the communities presented a continuous modification during the substrate degradation, the strongest changes occurred during the first 3 days. Therefore, this observation confirms that microbial specialization is early during SS-AD and progressive all along the reaction progress (Shi *et al.*, 2013). In addition, similar bacterial profiles were observed for both medium and coarse particle size conditions at a given sampling date.. Therefore, the microbial signature was not affected by particle size directly, but mainly by the system dynamics and performances.

5.4.2.7.5 Effect of straw particle size

This study showed that reducing the particle size from 10 mm to 1 mm does not affect the dry anaerobic digestion performances. The biogas production profile indicated that reaction dynamics and the microbial community structures were similar in the range of particle size tested. The community structures were mainly impacted by the reaction progress. However, it is often considered that particle size reduction increase the process kinetics and yields (Palmowski & Müller, 2000; Lindmark *et al.*, 2012). Here, it was showed that reducing particle size increases mainly the first metabolites production, since this flow increased strongly with the particle size reduction: 10 mm with 12 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$, 1 mm with 14 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$ and 0.25 mm with 26 $g_{COD}.g_{TS}^{-1}$. Therefore, the metabolic flux was related to the increase of soluble phase: 10.4, 12.9 and 27% for coarse, medium and fine fractions, respectively. This effect of the milling on the increase of soluble phase was previously described in the literature (Tamaki & Mazza, 2010). The present study shows that this effect is significant even at high inoculation rate, and concern only SS-AD (Motte *et al.*, 2013).

Apply milling, as a pretreatment of the SS-AD processes, requires a specific management of the soluble phase to avoid medium acidification. Two-stages processes should be an adequate option, since an optimization of the two phases of the process dynamics could be implemented (Karthikeyan & Visvanathan, 2012). After strong substrate milling pretreatment, a first stage of solid-state fermentation (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009b) should be performed in a first stage to maximize production of metabolites (hydrogen, VFA, ethanol). Then, in the second stage, process parameters could be optimized to enhance substrate transformation into methane (Motte *et al.*, 2013). However, such process configuration faced technical limitations such as soluble phase extraction.

5.4.2.8 Conclusion

This study showed that the start-up of SS-AD is strongly dependent on the soluble phase of the substrate while the end of the reaction is mainly limited by the substrate hydrolysis. Since reducing the particle size of lignocellulosic residue increases the concentration of soluble phase, the dynamics of SS-AD is strongly affected by comminution.

In fact, these soluble compounds are rapidly transformed into VFA, which can conduct to the medium acidification. Even if this phenomenon can be detected by analysis VFA or microbial community, it seems difficult to avoid the acidification phase during the startup phase. Process parameters or reactor configuration should therefore be adjusted in order to control this flow of metabolites.

5.4.2.9 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the University of Montpellier 2, France, for its financial support of JC Motte's PhD.

5.4.3 DISCUSSIONS DU CHAPITRE 5.4

Cette étude permet de valider plusieurs résultats développés durant la thèse, et confirmant que ces observations sont valables pour un taux d'inoculation plus important que ceux retenus jusqu'à présent (S/X > 15). Ainsi, la dynamique réactionnelle de la voie sèche s'établie en deux étapes consécutives : le démarrage de la réaction où la méthanogenèse est dépendante de la phase soluble du substrat, puis un ralentissement globale en raison d'une hydrolyse du substrat devenue limitante.

5.4.3.1 Dynamique réactionnelle et taille des particules

La dynamique réactionnelle décrite précédemment (section 5.3.2) est donc valable pour un taux d'inoculation plus important (S/X de 3). Ainsi, au démarrage de la réaction, la vitesse d'hydrolyse est plus rapide que la méthanogenèse et conduit à une accumulation de produits de fermentation, issus de la fraction la plus accessible du substrat: la phase soluble. Une période transitoire, correspondant à la consommation des AGV en fonction de leur biodégradabilité, survient ensuite. Lorsque le flux de métabolites est consommé, la réaction est limitée par l'hydrolyse du substrat. Comme observé tout au long du chapitre 5.3, l'avancement de la réaction est le principal facteur influençant les communautés bactériennes en digestion sèche. Cette modification de la biomasse microbienne est observée lors des premiers jours et correspond à une adaptation des bactéries au substrat (5.3.3), puis la structure des communautés bactériennes évolue progressivement tout au long de la réaction.

Dans les dernières étapes de la réaction, la vitesse d'hydrolyse du substrat est la limitation principale de la réaction (Zhang *et al.*, 2007b). Dans le cas de résidus agricoles, les limitations de l'activité hydrolytique proviennent d'une faible accessibilité aux parois dégradables (Monlau *et al.*, 2013). Or, le broyage favorise l'accessibilité du substrat par une fragmentation importante des tissus végétaux et un accès aux vacuoles des cellules (Wilson & Mertens, 1995; Silva *et al.*, 2011). Le broyage fin du substrat semble donc être un prétraitement de choix pour accélérer la dégradation du substrat. Pourtant, cette expérience a montré qu'en digestion sèche, les gains de performances potentiels dues aux prétraitements du substrat, sont limités par un fort risque d'acidification. Ce risque provient de la transformation rapide de la phase soluble du substrat en composés inhibiteurs (AGV). Dès lors que la consommation des métabolites n'est pas suffisamment rapide et/ou importante, une accumulation survient dans le milieu. En raison des faibles teneurs en eau de la digestion sèche, les composés inhibiteurs sont concentrés et peuvent conduire à une inhibition rapide de la méthanisation (Staley *et al.*, 2011). Le risque d'acidification pour les fines particules a été observé dans la section 5.1.3 lorsque les faibles taux d'inoculation étaient particulièrement contraignant (S/X de 15 à 25). Dans ce chapitre, le taux a été ajusté en fonction des recommandations de la littérature à un S/X de 3. Malgré des conditions d'inoculation moins contraignantes, les broyages fins augmentent malgré tous les risques

d'acidifications. Cette inhibition modifie les profils de communautés microbiennes (section 5.4.2). En revanche, pour les deux conditions expérimentales fonctionnelles (granulométrie moyenne et grosse), une faible variation entre les profils microbiens a été observée. La taille des particules ne conditionnent donc pas spécifiquement les communautés microbiennes.

5.4.3.2 Gestion de la phase soluble

Si les stratégies permettant de favoriser l'accessibilité du substrat sont à priori favorables pour optimiser la digestion sèche (section 5.3.2), il est nécessaire de diminuer le risque d'acidification des milieux. Ainsi, le broyage ou tout prétraitement conduisant à l'augmentation de la phase soluble du substrat, doivent être employés avec attention en voie sèche. L'optimisation de la digestion anaérobie par voie sèche mono-étape passe nécessairement par des stratégies de protection de la méthanogenèse face au flux initial de métabolites. Plusieurs approches semblent théoriquement possibles pour gérer ce phénomène.

Le profil de production de biogaz permet difficilement de prévoir l'acidification des digesteurs au cours de la digestion. Aussi, seule une analyse du milieu peut permettre l'anticipation de ce phénomène. La quantité de métabolites, devenant rapidement plus importante pour les conditions dysfonctionnelles, peut à priori permettre de suivre l'acidification. Or, l'inhibition par les AGV est dépendante de l'alcalinité du milieu, qui est fondamentale pour maintenir un pH du milieu proche de la neutralité. Un fort pouvoir tampon peut ainsi permettre de tolérer une plus forte quantité de métabolites. La quantité de produits de fermentation ne peut donc pas, à elle seule être un indicateur fiable d'une acidification du digesteur. Dans cet objectif, un indicateur est proposé dans la littérature : le ratio AGV/alcalinité (Anderson & Yang, 1992; Brown *et al.*, 2012). Enfin, le profil métabolique et les communautés microbiennes semblent impactés très tôt pour les conditions dysfonctionnelles. En effet, la distribution métabolique relativement simple pour les conditions favorables (acide acétique, propionique et butyrique, section 5.3.3 et 5.4.2) se complexifie et montre l'émergence d'acides gras volatils plus complexes (acides valérique et caproïque) pour les conditions dysfonctionnelles. Ce changement métabolique est associé à un changement des communautés bactériennes. La quantité et la distribution de métabolites ainsi que le changement de communauté microbienne peuvent donc rapidement mettre en évidence les signes d'inhibitions des digesteurs. Cependant leur usage est limité par la nécessité de prélever des échantillons en cours de réaction, ainsi que par une durée d'analyse ne permettant la mise en place rapide d'actions correctrices.

Lors d'une opération en mode discontinu, il semble indispensable de disposer d'un indicateur fiable pour anticiper la production de métabolites et donc la capacité de démarrage d'un digesteur. Or, la consommation des AGV est assurée par l'activité et l'abondance de la biomasse méthanogène. Le taux d'inoculation est donc un paramètre intimement lié à la consommation des produits de dégradation de la phase soluble. L'expérience du chapitre 5.1.3 a mis en évidence que le ratio S/X est un indicateur du

démarrage de la digestion sèche et de la cinétique réactionnelle, mais qu'il n'a pas d'effet sur les performances finales du procédé. Le ratio S/X est donc utile pour caractériser la capacité de démarrage des digesteurs. Or, le substrat dans son intégralité est considéré dans ce ratio alors que seule la phase soluble est dégradée durant cette période. Par conséquent, un ratio $S_{soluble}/X$ pourrait définir la capacité de démarrage des digesteurs. La phase soluble pouvant être évaluée simplement (Monlau *et al.*, 2012b), sa détermination permettrait une conduite prédictive de digesteurs. Enfin, puisque les inocula ne sont pas tous composés d'une même abondance en population méthanogènes (Cho *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013), la quantité d'inoculum pourrait être affinée en fonction de cette donnée : $S_{soluble}/X_{Archaea}$. Ce dernier indicateur suppose néanmoins l'usage d'analyses microbiologiques poussées peu adaptées à une utilisation sur site.

Le contrôle des conditions opératoires en amont du procédé peut avoir un impact sur le démarrage des digesteurs. Puisque certains AGV, tel que l'acide propionique, sont lentement dégradables (Vavilin & Lokshina, 1996), leur production doit être évitée. Cet aspect qualitatif dans la gestion de la phase soluble renvoi aux enseignements du chapitre 5.2.2, montrant la possibilité de modifier le profil métabolique par l'ajustement de la siccité. Un autre paramètre de procédé peut également modifier la nature et l'intensité du flux initial de métabolites : la température de fonctionnement. En effet, les conditions thermophiles favorisent l'hydrolyse du substrat et les rendements de fermentation (Converti *et al.*, 1999; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005a). Le flux de métabolites qui en découle est donc plus important en conditions thermophiles (Shi *et al.*, 2013). La nature du substrat doit aussi être prise en compte, puisque les substrats lignocellulosiques peuvent présenter de très grandes variations d'abondances de la phase soluble (Brown *et al.*, 2012). Ce phénomène survient pour un même substrat, puisque le chapitre 5.1.2 a montré que les feuilles de la paille de blé ont une part plus importante de phase soluble (≈ 19%) que les autres fractions morphologiques (tige ou épis à moins de 15%). Cette augmentation de la phase soluble est également au cœur des stratégies de prétraitement de la lignocellulose (Frigon & Guiot, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Par conséquent, de nombreux paramètres (substrat, température, alcalinité, siccité…) doivent être pris en compte pour appréhender les risques d'acidification lors de la mise en route d'un digesteur. Pour cette raison, les procédés mono-étapes semblent difficilement optimisables si ce n'est par le recours à une forte inoculation.

5.4.3.3 Optimisation séparée des deux phases de la réaction

Pour optimiser la méthanisation, il faut donc maximiser l'accessibilité du substrat tout en prenant garde aux risques d'acidification des digesteurs qui sont associés au flux initial de métabolites. A partir de ces enseignements, il est possible de recommander une dissociation des étapes de la réaction de digestion anaérobie par l'usage successif d'une étape de prétraitement poussé du substrat, de fermentation puis de méthanisation (Figure 5-50). Ce type de configuration permet d'optimiser chacune des étapes en fonction de leurs limitations respectives (Sträuber & Kleinsteuber, 2013). Malgré le potentiel de cette

configuration, les procédés à deux étapes sont encore peu étudiés dans la littérature (Kvesitadze *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

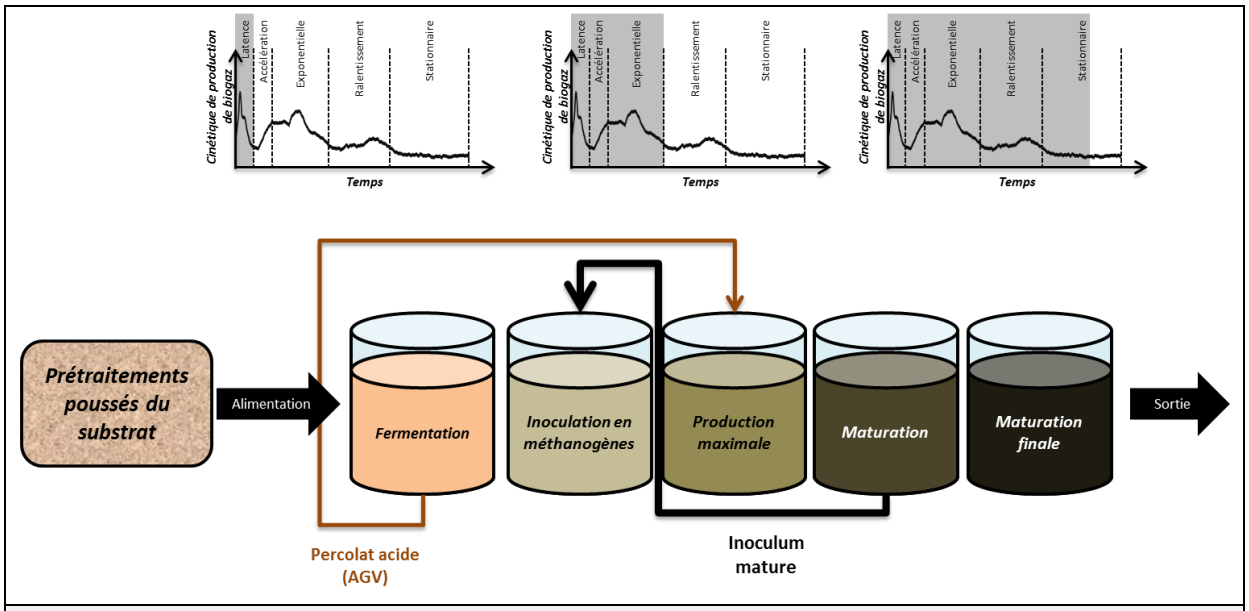


Figure 5-50 : Intérêt des procédés à deux étapes pour une optimisation de la digestion sèche.

Pourtant, il semble aisé d'ajouter ou de concevoir une étape de fermentation en amont des digesteurs secs (Figure 5-50). Au regard des résultats du chapitre 5.2, une faible inoculation et de fortes siccités devraient permettre d'orienter le système vers une fermentation efficace sans recours à des inoculas spécifiquement traités. L'objectif principal de cette étape de fermentation étant alors de transformer un maximum de sucres solubles en métabolites. La mise en contact du substrat et des micro-organismes en condition de faibles teneurs en eau serait alors au cœur des verrous technologiques (agitation, arrosage par les percolâts/lixiviats, mise en contact initial entre substrat et inoculum). Les AGV ainsi produits pourraient ensuite être envoyés vers un digesteur en phase de maturation ou valorisés en tant que produit (Clark *et al.*, 2009; FitzPatrick *et al.*, 2010). Après fermentation, le substrat fermenté serait ré-inoculé avec un inoculum dont la méthanogenèse est active. Cet apport de communautés méthanogènes actives, associé à la dilution des AGV résiduaires, pourrait alors permettre un démarrage de la production de méthane. La gestion des percolâts, tel qu'actuellement utilisé à l'échelle industrielle, serait alors au cœur du contrôle du procédé (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; Kusch *et al.*, 2011). Enfin, puisque ce type de configuration permet à priori d'éviter l'acidification des digesteurs, il est possible de réduire les taux d'inoculation et donc de maximiser la quantité de substrat introduite dans le digesteur.

Néanmoins, cette approche soulève plusieurs questionnements complémentaires, qui doivent être abordés de manière approfondie : Gestion de l'eau ? Bilan énergétique ? Risques de carence ? Risques d'inhibitions par les produits de dégradation des tissus ligneux ? En particulier, l'une des principales limitations techniques de cette

configuration réside dans la faisabilité technique de démarrer une activité méthanogène à partir d'un digesteur acidifié. Il s'agit donc d'assurer une dilution des métabolites et une inoculation suffisante pour permettre un démarrage de la méthanogenèse. De plus, la manipulation du chapitre 5.1.3 a montré que la teneur en eau est le critère principal pour optimiser la réaction tandis que l'inoculation assure le démarrage des digesteurs. Par conséquent l'ajout d'un inoculum et l'effet de dilution associée semble favorable pour un redémarrage de la méthanogenèse. La faisabilité du changement de communauté microbienne par un ajout changement d'inoculum et une dilution est supposée par les résultats de la section 5.3.3, où il a été montré que les seuls micro-organismes liés l'activité hydrolytique du substrat sont adhérés aux parois végétales. Puisqu'elles sont peu solidaires du substrat, il semble possible de pouvoir modifier par lixiviation les populations du compartiment liquide, siège des étapes ultérieures de la méthanisation.

5.4.4 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5.4

Ainsi, la dynamique réactionnelle de la voie sèche est liée à deux étapes consécutives : l'établissement de la réaction où la méthanogenèse est limitante, puis le ralentissement de la réaction globale où l'hydrolyse du substrat devient limitante. Cette étude a évaluée l'effet de la taille des particules au cours de la digestion par voie sèche, dans l'objectif de favoriser l'hydrolyse du substrat par une plus grande accessibilité. Néanmoins, il a été montré que la taille des particules n'impacte pas directement les performances de procédé et les équilibres entre populations microbiennes. Ainsi, l'impact du broyage est lié à la proportion de phase soluble qui a des conséquences importantes sur le démarrage des digesteurs par voie sèche.

Cette étude montre qu'il est nécessaire de trouver un optimum entre augmentation de l'accessibilité du substrat par prétraitement et risque d'acidification des digesteurs. Les procédés à deux étapes peuvent être intéressants pour résoudre ce dilemme et suggèrent une optimisation des cinétiques et des performances de la digestion sèche. Cependant, probablement en raison des faibles gammes de granulométrie testées, cette étude n'explique pas l'interaction entre la taille des particules et la teneur en eau, pourtant mis en évidence dans le chapitre 5.1.3. Des questionnements sur le gain en termes de cinétique, de performances ou l'impact sur la rhéologie du milieu sont donc toujours soulevés.

	Effet du broyage sur la digestion sèche
Message principal	Les réductions granulométriques augmentent les risques d'acidification des digesteurs par une augmentation importante du flux initial de métabolites.
Nouveautés	✓ Le broyage fin augmente fortement les risques d'acidification. ✓ La réduction de la taille des particules n'affecte pas la structuration des communautés microbiennes mais impacte le profil de la réaction. ✓ L'acidification d'un digesteur peut être détectée très tôt par le profil métabolique.
Confirmation de la littérature	✓ Les réacteurs acidifiés présentent des profils microbiens particuliers. (Abbassi-Guendouz *et al.*, 2013)
Hypothèses et perspectives	1) Développement de configurations avec trois étapes consécutives : broyage fin du substrat, fermentation de la phase soluble puis méthanisation des résidus. 2) Comprendre l'effet de la rhéologie des milieux en lien avec la granulométrie

Tableau 5-26 : Synthèse des résultats du chapitre 5.4.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de proposer des voies d'optimisation de la digestion anaérobie par voie sèche des résidus lignocellulosiques grâce à une compréhension fine de la dynamique réactionnelle dépendante de la relation entre le substrat et l'écosystème microbien. Pour parvenir à cet objectif, une stratégie particulière a donc été mise en œuvre pour simplifier la composition du milieu et la dynamique réactionnelle tout en conservant la complexité intrinsèque de la digestion sèche :

- Etude centrée sur un substrat modèle mais suffisamment complexe pour rendre compte des difficultés de dégradation des résidus lignocellulosiques agricoles.
- Choix des digesteurs discontinus pour évaluer précisément la notion de dynamique réactionnelle.
- Choix d'une faible inoculation pour ralentir la réaction biologique et suivre la croissance des micro-organismes les plus adaptés aux conditions expérimentales.

Si cet ensemble de stratégies a permis de simplifier de manière contrôlée la réaction biologique et le milieu, l'étude a requis des développements méthodologiques particuliers. Ainsi, un dispositif de prélèvement d'échantillons a été réalisé pour permettre un prélèvement d'échantillons de milieu sans perturbations du ciel gazeux. Ensuite, pour étudier la structuration des communautés microbiennes, un protocole de compartimentation de la biomasse microbienne a spécifiquement été développé.

Ces stratégies et outils innovants ont permis progressivement de répondre aux questionnements de la thèse: i) identification et étude des principaux paramètres de procédé de la voie sèche, ii) étude de l'activité fermentaire en digestion sèche, iii) étude l'activité hydrolytique au cours de la digestion sèche, iv) effets des paramètres de procédé sur la dynamique de dégradation. Les résultats de cette thèse ont donc apporté un éclairage sur la dynamique réactionnelle de biodégradation des résidus lignocellulosiques en voie sèche. Cette dynamique réactionnelle est un processus en plusieurs étapes caractérisée par:

- Une méthanogenèse en retard sur l'activité fermentaire au début de la réaction conduisant à une accumulation de métabolites.
- Une consommation progressive des métabolites en fonction de leur biodégradabilité.
- Puis une hydrolyse devenue limitante lorsque le substrat restant est plus difficilement accessible.

Cette thèse apporte donc de nombreux éléments pour mieux comprendre la digestion par voie sèche. Cependant, il reste un besoin de validation de ces observations sur des procédés proches de la réalité industrielle (digesteurs continus, codigestion). En effet, la forte adaptation au substrat des inocula, les problématiques de mélange ou de recirculation

des digestats peuvent impacter notablement le comportement du système. De même, plusieurs paramètres restent en suspens tels que l'alcalinité, la température ou l'agitation.

Qu'elles soient du domaine académique ou opérationnel, ce travail ouvre de nombreuses perspectives pour optimiser et élargir l'applicabilité de la digestion anaérobie par voie sèche. La voie sèche est un processus dynamique en deux étapes consécutives : fermentation de la fraction facilement accessible du substrat puis hydrolyse du substrat. La première phase conditionne la capacité de démarrage et doit être optimisée de façon à ne pas acidifier le procédé. Ces perspectives concernent :

- La prise en compte de la fraction facilement accessible du substrat, en lien avec l'inoculation et l'alcalinité.
- La détection précoce de l'acidification d'un digesteur par l'étude du profil métabolique.
- Le fait d'éviter les prétraitements favorisant la phase soluble des substrats en cas d'absence des stratégies d'élimination des métabolites produits.

L'accessibilité du substrat est au cœur de la seconde étape de la réaction où l'hydrolyse du substrat est limitante. L'accessibilité du substrat étant le moteur de cette phase réactionnelle, les perspectives d'optimisation concernent :

- Le fort intérêt des broyages fins pour augmenter l'accessibilité des substrats.
- La mise en place de nouvelles stratégies de prétraitements dédiées à l'élimination des cires, des silices et de la paroi tertiaire.
- L'ajustement des paramètres de procédé favorisant les espèces responsables de l'activité hydrolytique des tissus ligneux (après identification de ces espèces).
- L'exploitation des enseignements issus d'autres écosystèmes (sols, rumen, compost) dégradant la lignocellulose, puisque le processus général de dégradation est similaire à la méthanisation.

Certaines perspectives et inconnues concernent plus spécifiquement la digestion anaérobie par voie sèche :

- Comprendre l'effet de la rhéologie des milieux en lien avec la granulométrie.
- Vérifier si la limite eau libre/eau liée peut être employée comme facteur prédictif d'un changement de métabolisme défavorable à la digestion anaérobie.
- Effet de la morphologie de la paille sur les hétérogénéités locales dans les milieux secs.
- Etude de la mobilité des populations microbiennes sur le substrat en conditions de faibles teneurs en eau.

Enfin, le protocole de compartimentation de la biomasse microbienne ayant fourni de bons résultats, il doit être optimisé par l'identification précise du contenu des compartiments. Puisque ce protocole répond à un besoin analytique pour l'étude de la structuration de la biomasse microbienne sur des supports biodégradables, son applicabilité sur des digestats de propriétés différentes doit cependant être éprouvée.

Cette thèse montre donc que les paramètres de procédé ne peuvent être maitrisés sans la compréhension de leurs impacts sur l'environnement local de la digestion anaérobie. De par la grande complexité des substrats et les importantes capacités d'adaptation des micro-organismes, l'optimisation de la digestion par voie sèche semble devoir passer par la recherche d'une plus grande accessibilité physique du substrat tout en gérant sa fraction facilement fermentescible pour éviter l'acidification du milieu. Ainsi, cette étude portant sur plusieurs échelles spatiales et temporelles permet de remettre l'interaction entre les micro-organismes et le substrat au cœur des performances du procédé.

7 REFERENCES

Abbassi-Guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J.-P., Steyer, J.-P. & Escudié, R. (2012). Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresour. Technol.* **111**, 55–61.

Abbassi-Guendouz, A., Trably, E., Hamelin, J., Dumas, C., Steyer, J.P., Delgenès, J.-P. & Escudié, R. (2013). Microbial community signature of high-solid content methanogenic ecosystems. *Bioresour. Technol.* **133**, 256–262.

Abubaker, J., Risberg, K. & Pell, M. (2012). Biogas residues as fertilisers – Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Appl. Energy* **99**, 126–134.

Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Buffière, P., Bernet, N. & Steyer, J.-P. (2008). Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **47**, 1968–1975.

Ademe. (1998). *Résidus de culture : Paille de cereales*.

Ademe. (2008). État des lieux et potentiel du biométhane carburant. *Ademe*.

Ademe. (2009). Methanisation agricole et utilisation de cultures energetiques en codigestion. *Gestion*.

Agbagla-Dohnani, A., Nozière, P., Clément, G. & Doreau, M. (2001). In sacco degradability, chemical and morphological composition of 15 varieties of European rice straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* **94**, 15–27.

Aguilar, A., Casas, C. & Lema, J.M. (1995). Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: Kinetics and inhibition. *Water Res.* **29**, 505–509.

Ahn, T.S., Choi, S.I. & Byeon, M.S. (1995). Observation and Enumeration of Attached Bacteria on Cellulose Film. *J. microbiolgy* **33**, 1–4.

Ahring, B.K., Sandberg, M. & Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 559–565.

Ahring, B.K. & Westermann, P. (1988). Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2393–7.

Akin, D. & Burdick, D. (1975). Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Sci.* **15**, 661–668.

Alexandre, S., Gault, J., Guerin, A.-J., Lefevre, E., Menthiere, C. de, Rathouis, P., Texier, P.-H., Thibault, H.-L. & Toussaint, X. (2012). *Les usages non alimentaires de la biomasse - Tome 1*.

Alinia, R., Zabihi, S., Esmaeilzadeh, F. & Kalajahi, J.F. (2010). Pretreatment of wheat straw by supercritical CO2 and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Biosyst. Eng.* **107**, 61–66.

Amani, T., Nosrati, M. & Sreekrishnan, T. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environ. Rev.* **18**, 255–278.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., Hrbek, R., Friedel, J., Pötsch, E., Wagentristl, H., Schreiner, M. & Zollitsch, W. (2007). Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresour. Technol.* **98**, 3204–12.

Anderson, G.K. & Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environ. Res.* **64**, 53–59.

Andersson, J. (2002). Evaluation of straw as a biofilm carrier in the methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion of crop residues. *Bioresour. Technol.* **85**, 51–56.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. & van Lier, J.B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* **59**, 927–34.

Antongiovanni, M. & Sargentini, C. (1991). Variability in chemical composition of straws. *Options Méditerranéennes-Séries Séminaires* **16**, 49–53.

APHA. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th edn. Washington.

De Baere, L. (2000). Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. *Water Sci. Technol.* **41**, 283–90.

De Baere, L. & Mattheeuws, B. (2010). State of the art of anaerobic digestion in Europe. In *International Water Association, 12th World Congress on Anaerobic Digestion, 31 Oct – 4 Nov. 2010, Guadalajara*: 1–7.

Barakat, A., Monlau, F., Steyer, J.-P. & Carrere, H. (2012). Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour. Technol.* **104**, 90–9.

Barakat, A., de Vries, H. & Rouau, X. (2013). Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.*

Bastidas-Oyanedel, J.-R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R.J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J.-P. & Batstone, D.J. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* **110**, 503–9.

Battistoni, P., Fava, G., Stanzini, C., Cecchi, F. & Bassetti, A. (1993). Feed characteristics and digester operative conditions as parameters affecting the rheology of digested municipal solid-wastes. *Water Sci. Technol.* **27**, 37–45.

Bauer, A., Bösch, P., Friedl, A. & Amon, T. (2009). Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production **142**, 50–55.

Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B. & Recous, S. (2006). Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant Soil* **281**, 291–307.

Bhargava, P.K., Ørskov, E.R. & Walli, T.K. (1988). Rumen degradation of straw 4. Selection and degradation of morphological components of barley straw by sheep. *Anim. Prod.* **47**, 105–110.

Boizot, N. & Charpentier, J. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cah. des Tech. l'Inra* 79–82.

Bollon, J., Benbelkacem, H., Gourdon, R. & Buffière, P. (2013). Measurement of diffusion coefficients in dry anaerobic digestion media. *Chem. Eng. Sci.* **89**, 115–119.

Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., Traverso, P. & Cecchi, F. (2003). Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. *Bioresour. Technol.* **86**, 123–9.

Brouckaert, C.J., Foxon, K.M., Osborne, C.F. & Lees, C.M. (2013). The role of CO2 liquid-gas exchange in pH prediction for anaerobic digestion modelling. In *International Water Association, 13th World Congress on Anaerobic Digestion, 25 - 28 June 2013, Santiago de Compostela , Spain.*: 132. Santiago de Compostela.

Brown, D. (2012). *Comparison of Solid-State to Liquid Phase Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass for Biogas Production*. Ohio State University.

Brown, D., Shi, J. & Li, Y. (2012). Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. *Bioresour. Technol.* **124**, 379–86.

Brunetti, G., Soler-Rovira, P., Matarrese, F. & Senesi, N. (2009). Composition and structural characteristics of humified fractions during the co-composting process of spent mushroom substrate and wheat straw. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10859–65.

Buffière, P., Bayard, R. & Germain, P. (2009). *Freins et développements de la filière biogaz : les besoins en recherche et développement*.

Buffière, P. & Frederic, S. (2008). Les technologies de la méthanisation des résidus solides. *L'eau, l'insustrie, les nuisances* 14–19.

Buffière, P., Frederic, S., Marty, B. & Delgenes, J.-P. (2008). A comprehensive method for organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic biodegradability. *Water Sci. Technol.* **58**, 1783–8.

Buffière, P., Loisel, D., Bernet, N. & Delgenes, J.-P. (2006). Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Sci. Technol.* **53**, 233.

Buswell, A. & Hatfiled, W. (1936). *Anaerobic fermentations*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* Buletin No. Urbana: Division of the State Water Survey.

Cecchi, F., Pavan, P., Mata-Alvarez, J., Bassetti, A. & Cozzolino, C. (1991). Anaerobic digestion of municipal solid waste: Thermophilic vs. mesophilic performance at high solids. *Waste Manag. Res.* **9**, 305–315.

Chanakya, H.N. & Khuntia, H.K. (2013). Treatment of gray water using anaerobic biofilms created on synthetic and natural fibers. *Process Saf. Environ. Prot.* 1–7.

Chang, V.S. & Holtzapple, M.T. (2000). Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 5–38.

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* **11**, 265–270.

Chen, Y., Cheng, J.J. & Creamer, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* **99**, 4044–64.

Chesson, A., Gardner, P.T. & Wood, T.J. (1997). Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *J. Sci. Food Agric.* **75**, 289–295.

Chesson, A., Gordon, A.H. & Lomax, J.A. (1983). Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1330–1340.

Cho, S.-K., Im, W.-T., Kim, D.-H., Kim, M.-H., Shin, H.-S. & Oh, S.-E. (2013). Dry anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and methanogenic community analysis. *Bioresour. Technol.* **131**, 210–7.

Cioabla, A.E., Ionel, I., Dumitrel, G.-A. & Popescu, F. (2012). Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 39.

Clark, J.H., Deswarte, F.E.I. & Farmer, T.J. (2009). The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **3**, 72–90.

Clarke, W.P. & Alibardi, L. (2010). Anaerobic digestion for the treatment of solid organic waste: what’s hot and what's not. *Waste Manag.* **30**, 1761–2.

Converti, a., Del Borghi, a., Zilli, M., Arni, S. & Del Borghi, M. (1999). Anaerobic digestion of the vegetable fraction of municipal refuses: mesophilic versus thermophilic conditions. *Bioprocess Eng.* **21**, 371.

Cord-Ruwisch, R., Seitz, H. & Conrad, R. (1988). The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **1**, 350–357.

Da Costa Lopes, A.M., João, K.G., Rubik, D.F., Bogel-Łukasik, E., Duarte, L.C., Andreaus, J. & Bogel-Łukasik, R. (2013). Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. *Bioresour. Technol.* **142**, 198–208.

Cui, Z., Shi, J. & Li, Y. (2011). Solid-state anaerobic digestion of spent wheat straw from horse stall. *Bioresour. Technol.* **102**, 9432–9437.

Currie, H. a & Perry, C.C. (2007). Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Ann. Bot.* **100**, 1383–9.

Delbès, C., Leclerc, M., Zumstein, E., Godon, J.J. & Moletta, R. (2001). A molecular method to study population and activity dynamics in anaerobic digestors. *Water Sci. Technol.* **43**, 51–7.

Demirbas, a. (2004). Combustion characteristics of different biomass fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* **30**, 219–230.

Desai, S.G., Guerinot, M.L. & Lynd, L.R. (2004). Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in Thermoanaerobacterium saccharolyticum JW/SL-YS485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 600–5.

Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A. a, Guedes, C. V, Ferreira, L.M.M., Cone, J.W., Marques, G.S.M., Barros, A.R.N. & Rodrigues, M. a M. (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* **100**, 4829–35.

Dresboll, D. & Thorupkristensen, K. (2005). Structural differences in wheat (), hemp () and () affect the quality and stability of plant based compost. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* **107**, 81–89.

Dresbøll, D.B. & Magid, J. (2006). Structural changes of plant residues during decomposition in a compost environment. *Bioresour. Technol.* **97**, 973–81.

Dumas, C., Silva, G.G.D., Rouau, X., Carrère, H. & Steyer, J.-P. (2010). Wheat straw milling effect on biogas production. In *International Water Association, 12th World Congress on Anaerobic Digestion, 31 Oct – 4 Nov. 2010, Guadalajara , Mexico.*: 1–7.

EEA. (2013). *EU bioenergy potential from a resource-efficiency perspective*.

Engels, F.M. & Schuurmans, J.L.L. (1992). Relationship between structural development of cell walls and degradation of tissues in maize stems. *J. Sci. Food Agric.* **59**, 45–51.

Escudié, R. (2011). *Hydrodynamique des bioréacteurs et mécanismes d'interaction avec les matrices biologiques : applications aux procédés de traitement d'effluents liquides et de déchets solides*. Université de Montpellier 2.

FAL. (2007). *Production de biogaz par fermentation voire sèche de résidus organiques , de sous-produits et de déchets agricoles*. *Cent. fédéral Rech. Agric.*

Fan, Y.-T., Zhang, Y.-H., Zhang, S.-F., Hou, H.-W. & Ren, B.-Z. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresour. Technol.* **97**, 500–5.

Fang, H., Li, C. & Zhang, T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int. J. Hydrogen Energy* **31**, 683–692.

Fdéz-Güelfo, L. a, Alvarez-Gallego, C., Sales Márquez, D. & Romero García, L.I. (2010). Start-up of thermophilic-dry anaerobic digestion of OFMSW using adapted modified SEBAC inoculum. *Bioresour. Technol.* **101**, 9031–9.

Fernández, B., Porrier, P. & Chamy, R. (2001). Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of solid waste anaerobic digesters. *Water Sci. Technol.* **44**, 103–8.

FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F. & Whitney, R.A. (2010). A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.* **101**, 8915–22.

Forster-Carneiro, T., Pérez, M. & Romero, L.I. (2008). Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresour. Technol.* **99**, 6994–7002.

Forster-Carneiro, T., Pérez, M., Romero, L.I. & Sales, D. (2007). Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: focusing on the inoculum sources. *Bioresour. Technol.* **98**, 3195–203.

Frigon, J.-C. & Guiot, S.R. (2010). Biomethane production from starch and lignocellulosic crops : a comparative review. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **4**, 447–458.

Gagnaire, N., Gabrielle, B. & Silveira, J. Da. (2006). *Une approche économique, énergétique et environnementale du gisement et de la collecte des pailles et d'une utilisation pour les filières éthanol*.

Garcia-Bernet, D., Buffière, P., Latrille, E., Steyer, J.-P. & Escudié, R. (2011a). Water distribution in biowastes and digestates of dry anaerobic digestion technology. *Chem. Eng. J.* **172**, 924–928.

Garcia-Bernet, D., Loisel, D., Guizard, G., Buffière, P., Steyer, J.P. & Escudié, R. (2011b). Rapid measurement of the yield stress of anaerobically-digested solid waste using slump tests. *Waste Manag.* **31**, 631–5.

Ghanimeh, S., El Fadel, M. & Saikaly, P. (2012). Mixing effect on thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* **117**, 63–71.

Giacomini, S.J., Recous, S., Mary, B. & Aita, C. (2007). Simulating the effects of N availability, straw particle size and location in soil on C and N mineralization. *Plant Soil* **301**, 289–301.

Van Ginkel, S. & Logan, B.E. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9351–6.

De Gioannis, G., Muntoni, A., Polettini, A. & Pomi, R. (2013). A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manag.*

Goller, C.C. & Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 37–66.

Gómez, X., Cuetos, M.J., Cara, J., Morán, a. & García, a. I. (2006). Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes. *Renew. Energy* **31**, 2017–2024.

Goupy, J. (2000). Modélisation par les plans d'expériences. *Tech. l'ingénieur* **R 275**, 1–23.

Grotkjaer, T., Dam-Johansen, K. & Jensen, A. (2003). An experimental study of biomass ignition. *Fuel* **82**, 825–833.

Guendouz, J., Buffière, P., Cacho, J., Carrère, M. & Delgenes, J.-P. (2010). Dry anaerobic digestion in batch mode: design and operation of a laboratory-scale, completely mixed reactor. *Waste Manag.* **30**, 1768–71.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H. & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**, 10660–10673.

Gy, P. (1992). *Sampling of heterogeneous and dynamic material systems*. *Sci. Technol.* Amsterdam: Elsevier science publisher BV.

Gy, P. (1998). Echantillonnage - P220. *Tech. l'ingénieur*.

Habouzit, F. (2010). *Rôle des matériaux-supports sur la mise en place du biofilm : Application au démarrage d'un procédé de méthanisation*. Université de Montpellier II.

Han, G., Deng, J., Zhang, S., Bicho, P. & Wu, Q. (2010). Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **31**, 28–33.

Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J. Med. Microbiol.* **59**, 1–7.

Hansen, K.H., Angelidaki, I. & Ahring, B.K. (1998). Anaerobic Digestion of Swine Manure: Inhibition By Ammonia. *Water Res.* **32**, 5–12.

Harper, S.H.T. & Lynch, J.M. (1981). The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 1057–1062.

Harper, S.R. & Pohland, F.G. (1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 585–602.

Hatfield, R. & Fukushima, R.S. (2005). Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Sci.* **45**, 832.

Healy, J.B. & Young, L.Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 84–9.

Heck, J.X., Flôres, S.H., Hertz, P.F. & Ayub, M.A.Z. (2005). Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by Bacillus coagulans BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochem.* **40**, 107–112.

Hendriks, a T.W.M. & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **100**, 10–8.

Heyne, E.G. (1987). Morphology and Anatomy of the Wheat Plant. In *Wheat and Wheat Improvement*: 33–75. E. G. Heyne (Ed). .

Hodson, M.J., White, P.J., Mead, a & Broadley, M.R. (2005). Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Ann. Bot.* **96**, 1027–46.

Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 87–107.

Hu, Z.-H., Yu, H.-Q. & Zhu, R.-F. (2005). Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **55**, 233–238.

Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N., Stams, a J. & Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* **9**, 213–24.

Le Hyaric, R., Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudié, R. & Buffière, P. (2012). Influence of moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 1032–1035.

Le Hyaric, R., Chardin, C., Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudié, R. & Buffière, P. (2011). Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. *Bioresour. Technol.* **102**, 822–827.

Ivanova, G., Rákhely, G. & Kovács, K.L. (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by Caldicellulosiruptor saccharolyticus and comparison with related studies. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 3659–3670.

Izumi, K., Okishio, Y., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S. & Toda, T. (2010). Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **64**, 601–608.

Jackowiak, D., Frigon, J.-C., Ribeiro, T., Pauss, A. & Guiot, S.R. (2011). Enhancing solubilisation and methane production kinetic of switchgrass by microwave pretreatment. *Bioresour. Technol.* **102**, 3535–40.

Jannot, Y. (2006). *Du séchage des produits alimentaires tropicaux à la caractérisation thermophysique des solides*. Université de Bordeaux I.

Jędrczak, A. & Królik, D. (2007). Influence of paper particle size on the efficiency of digestion process. *Environ. Prot. Eng.* **33**, 147–155.

Jensen, P., Hardin, M. & Clarke, W. (2008). Measurement and quantification of sessile and planktonic microbial populations during the anaerobic digestion of cellulose. *Water Sci. Technol.* **57**, 465–469.

Jha, A., Li, J., Nies, L. & Zhang, L. (2011). Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. *African J. Biotechnol.* **10**, 14242–14253.

Joe Shaw, a., Jenney, F.E., Adams, M.W.W. & Lynd, L.R. (2008). End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, Thermoanaerobacterium saccharolyticum. *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 453–458.

Jönsson, L.J., Alriksson, B. & Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 16.

Kaji, M., Taniguchi, Y., Matsushita, O., Katayama, S., Miyata, S., Morita, S. & Okabe, A. (1999). The hydA gene encoding the H(2)-evolving hydrogenase of Clostridium perfringens: molecular characterization and expression of the gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**, 329–36.

Kamdem, I., Hiligsmann, S., Vanderghem, C., Bilik, I., Paquot, M. & Thonart, P. (2013). Comparative biochemical analysis during the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass from six morphological parts of Williams Cavendish banana (Triploid Musa AAA group) plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.*

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P. & Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* **100**, 2562–8.

Karim, K., Hoffmann, R., Thomas Klasson, K. & Al-Dahhan, M.H. (2005). Anaerobic digestion of animal waste: effect of mode of mixing. *Water Res.* **39**, 3597–606.

Karthikeyan, O.P. & Visvanathan, C. (2012). Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* **12**, 257–284.

Kersters, I., Maestrojuan, G.M., Torck, U., Vancanneyt, M., Kersters, K. & Verstraete, W. (1994). Isolation of Coprothermobacter proteolyticus from an anaerobic digest and further characterization of the species. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 289–295.

Kim, I., Kim, D. & Hyun, S. (2000). Effect of particle size and sodium ion concentration on anaerobic thermophilic food waste digestion. *Water Sci. Technol. a J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* **41**, 67.

Kristensen, J.B. (2008). *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Substrate interactions and high solids loadings.* Forest & L. Denmark.

Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jørgensen, H. & Elder, T. (2008). Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels* **1**, 5.

Kuhad, R.C., Singh, a & Eriksson, K.E. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **57**, 45–125.

Kusch, S., Schäfer, W. & Kranert, M. (2011). Dry digestion of organic residues. In *Integrated Waste Management - Volume I*: 115–134. Kumar, S. (Ed). CC BY-NC-SA 3.0 license.

Kvesitadze, G., Sadunishvili, T., Dudauri, T., Zakariashvili, N., Partskhaladze, G., Ugrekhelidze, V., Tsiklauri, G., Metreveli, B. & Jobava, M. (2011). Two-stage anaerobic process for bio-hydrogen and bio-methane combined production from biodegradable solid wastes. *Energy* **37**, 94–102.

De la Rubia, M. a., Romero, L.I., Sales, D. & Perez, M. (2005). Temperature conversion (mesophilic to thermophilic) of municipal sludge digestion. *Environ. Energy Eng.* **51**, 2581–2586.

Lagoudaki, M. & Demertzis, P.G. (1993). Equilibrium moisture characteristics of foods : hysteris effects and isotherm models. *Leb. - Technol.* **26**, 71–77.

Latrille, E., Trably, E. & Larroche, C. (2011). Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. In *Techniques de l'ingénieur - BIO 3351*: 1–19.

Lehtomäki, A., Huttunen, S., Lehtinen, T.M. & Rintala, J. a. (2008). Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresour. Technol.* **99**, 3267–78.

Lequart, C., Ruel, K., Lapierre, C., Pollet, B. & Kurek, B. (2000). Abiotic and enzymatic degradation of wheat straw cell wall: a biochemical and ultrastructural investigation. *J. Biotechnol.* **80**, 249–59.

Levin, D.B., Pitt, L. & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 173–185.

Li, A., Chu, Y., Wang, X., Ren, L., Yu, J., Liu, X., Yan, J., Zhang, L., Wu, S. & Li, S. (2013). A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 3.

Li, J., Ban, Q., Zhang, L. & Jha, A.K. (2012). Syntrophic propionate degradation in anaerobic digestion: a review. *Int. J. Agric. Biol.* **14**, 843–850.

Li, Y. & Liew, L.N. (2011). Solid-State Anaerobic Digestion for Energy Production from Organic Waste. *Fact sheet Agric. Nat. ressources* 1–4.

Lianhua, L., Dong, L., Yongming, S., Longlong, M., Zhenhong, Y. & Xiaoying, K. (2010). Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**, 7261–7266.

Liew, L.N., Shi, J. & Li, Y. (2012). Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy* **46**, 125–132.

Lindmark, J., Leksell, N., Schnürer, A. & Thorin, E. (2012). Effects of mechanical pre-treatment on the biogas yield from ley crop silage. *Appl. Energy* **97**, 498–502.

Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., Han, B. & Xing, X.-H. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresour. Technol.* **135**, 292–303.

Lü, F., Hao, L., Zhu, M., Shao, L. & He, P. (2012). Initiating methanogenesis of vegetable waste at low inoculum-to-substrate ratio: Importance of spatial separation. *Bioresour. Technol.* **105**, 169–73.

Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B. & Recous, S. (2009a). Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *Eur. J. Soil Sci.* **60**, 176–185.

Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B., Watteau, F., Villemin, G. & Recous, S. (2009b). Soil biodegradation of maize root residues: Interaction between chemical characteristics and the presence of colonizing micro-organisms. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1253–1261.

Martin, D. (2001). The Site of Reaction in Solid-State Digestion. *Process Saf. Environ. Prot.* **79**, 29–37.

Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N. & Teixeira, J. a. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* **29**, 365–73.

Mata-Alvarez, J., Macé, S. & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* **74**, 3–16.

McAllister, T. a, Bae, H.D., Jones, G. a & Cheng, K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* **72**, 3004–18.

McKean, W. & Jacobs, R. (1997). *Wheat straw as a paper fiber source. Washington, USA Clean Washingt. Cent.*

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresour. Technol.* **83**, 37–46.

McMahon, K.D., Stroot, P.G., Mackie, R.I. & Raskin, L. (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions--II: Microbial population dynamics. *Water Res.* **35**, 1817–27.

Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. & Cauquil, L. (2009). StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol. Ecol. Resour.* **9**, 1359–63.

Michel-Savin, D., Marchal, R. & Vandecasteele, J. (1990). Control of the selectivity of butyric acid production and improvement of fermentation performance with Clostridium tyrobutyricum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 387–392.

Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie. (2011). La feuille de route européenne Climat 2050.

Modenbach, A. a. & Nokes, S.E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy* **56**, 526–544.

Moletta, R. (2008). *La méthanisation*. Tec & Doc. Paris: Lavoisier.

Moletta, R. & Cansell, F. (2003). *Méthanisation des déchets organiques*.

Mongeau, R. & Brassard, R. (1982). Insoluble dietary fiber from breakfast cereals and brans: bile salt binding and water-holding capacity in relation to particle size. *Cereal Chem.* **59**, 413–417.

Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P. & Carrere, H. (2012a). Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresour. Technol.* **120**, 241–7.

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.P. & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **43**, 260–322.

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P. & Carrere, H. (2012b). Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12217–25.

Monties, B., Ln, R.A. & Chimie, L. De. (1984). Dosage de la lignine insoluble en milieu acide : influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* **4**, 387–392.

Motte, J.-C., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J.-P., Steyer, J.-P. & Dumas, C. (2013). Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 141–148.

Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, M.S.T. & Mattiasson, B. (2006). Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renew. Energy* **31**, 2385–2392.

Müller, J.A. (2003). Comminution of organic material. *Chem. Eng. Technol.* **26**, 207–217.

Nasirian, N., Almassi, M., Minaei, S. & Widmann, R. (2011). Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* **36**, 411–420.

Nielsen, H., Uellendahl, H. & Ahring, B. (2007). Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* **31**, 820–830.

Nougarède, A., Heller, R., Champagnat, P. & Ozenda, P. (1969). *Biologie végétale: Cytologie*. Université du Michigan: Masson et Cie.

O'Sullivan, C. a, Burrell, P.C., Clarke, W.P. & Blackall, L.L. (2005). Structure of a cellulose degrading bacterial community during anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 871–8.

Odlare, M., Pell, M. & Svensson, K. (2008). Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Manag.* **28**, 1246–53.

Ollivier, B.M., Mah, R. a., Ferguson, T.J., Boone, D.R., Garcia, J.L. & Robinson, R. (1985). Emendation of the Genus Thermobacteroides: Thermobacteroides proteolyticus sp. nov., a Proteolytic Acetogen from a Methanogenic Enrichment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 425–428.

Olofsson, K., Bertilsson, M. & Lidén, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels* **1**, 7.

Orzua, M.C., Mussatto, S.I., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. a. & Aguilar, C.N. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* **30**, 24–27.

Ovreås, L., Forney, L., Daae, F.L. & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3367–73.

Palmowski, L.M. & Müller, J. a. (2000). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **41**, 155–62.

Pandey, A. (2004). *Concise encyclopedia of bioresource technology*. Food products Press.

Parikh, J., Channiwala, S. a. & Ghosal, G.K. (2007). A correlation for calculating elemental composition from proximate analysis of biomass materials. *Fuel* **86**, 1710–1719.

Payot, T., Chemaly, Z. & Fick, M. (1999). Lactic acid production by Bacillus coagulans—kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 191–199.

Pérez, J. & González, A. (2007). Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuelâ€ • ethanol in a batch reactor. *J. Chem. …* **938**, 929–938.

Philippidis, G.P. & Smith, T.K. (1995). Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51-52**, 117–124.

Pohl, M., Heeg, K. & Mumme, J. (2013). Anaerobic digestion of wheat straw – performance of continuous solid-state digestion. *Bioresour. Technol.*

Pohl, M., Mumme, J., Heeg, K. & Nettmann, E. (2012). Thermo- and mesophilic anaerobic digestion of wheat straw by the upflow anaerobic solid-state (UASS) process. *Bioresour. Technol.* **124C**, 321–327.

Pommier, S., Chenu, D., Quintard, M. & Lefebvre, X. (2007). A logistic model for the prediction of the influence of water on the solid waste methanization in landfills. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 473–482.

Pommier, S., Llamas, A.M. & Lefebvre, X. (2010). Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. *Bioresour. Technol.* **101**, 463–8.

Quéméneur, M., Bittel, M., Trably, E., Dumas, C., Fourage, L., Ravot, G., Steyer, J.-P. & Carrère, H. (2012a). Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**, 10639–10647.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrère, H. & Trably, E. (2012b). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**, 3150–3159.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.-P. & Trably, E. (2011). Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* **36**, 3870–3879.

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Orticoni, M.-T. & Steyer, J.-P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**, 4975–4985.

Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S. a., Christensen, J.H. & Boerjan, W. (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.* **3**, 29–60.

Raposo, F., de la Rubia, M. a, Borja, R., Alaiz, M., Beltrán, J., Cavinato, C., Clinckspoor, M., Demirer, G., Diamadopoulos, E., Helmreich, B., Jenicek, P., Martí, N., Méndez, R., Noguerol, J., Pereira, F., Picard, S. & Torrijos, M. (2009). An interlaboratory study as useful tool for proficiency testing of chemical oxygen demand measurements using solid substrates and liquid samples with high suspended solid content. *Talanta* **80**, 329–37.

Rapport, J., Zhang, R., Jenkins, B. & Williams, R. (2008). Current anaerobic digestion technologies used for treatment of municipal organic solid waste. *Calif. Environ. Prot. Agency* 1–90.

Raveendran, K., Ganesh, A. & Khilar, K.C. (1995). Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. *Fuel* **74**, 1812–1822.

Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P. & Jackson, R. (2011). *Campbell biology*. 9th editio. Harlow.

Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J. & Gao, L. (2009). Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnol. Adv.* **27**, 1051–60.

Requillart, V. (1984). *Valorisation énergétique des pailles de céréales*. Pyc. Paris.

Rincón, B., Banks, C.J. & Heaven, S. (2010). Biochemical methane potential of winter wheat (Triticum aestivum L.): Influence of growth stage and storage practice. *Bioresour. Technol.* **101**, 8179–84.

Robledo-Narváez, P.N., Muñoz-Páez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M., Ríos-Leal, E., Calva-Calva, G., Ortega-Clemente, L.A., Rinderknecht-Seijas, N., Estrada-Vázquez, C., Ponce-Noyola, M.T. & Salazar-Montoya, J.A. (2013). The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J. Environ. Manage.* **128**, 126–137.

Roblin, G. (1998). Microsocopie. *Tech. l'Ingénieur* **R 6710**, 1–14.

Rose, J.K.C. (2003). *The plant cell wall*. CRC Press. New York: Blackwell.

Rousselon, N., Delgenès, J.-P. & Godon, J.-J. (2004). A new real time PCR (TaqMan PCR) system for detection of the16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J. Microbiol. Methods* **59**, 15–22.

Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H. & Malpei, F. (2013). A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Appl. Energy* **104**, 62–70.

Sander, B. (1997). Properties of Danish biofuels and the requirements for power production. *Biomass and Bioenergy* **12**, 177–183.

Sangnark, A. & Noomhorm, A. (2003). Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. *Food Chem.* **80**, 221–229.

Sapci, Z. (2013). The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws. *Bioresour. Technol.* **128**, 487–94.

Sharma, S.K., Mishra, I., Sharma, M. & Saini, J. (1988). Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. *Biomass* **17**, 251–263.

Shi, J., Wang, Z., Stiverson, J. a., Yu, Z. & Li, Y. (2013). Reactor performance and microbial community dynamics during solid-state anaerobic digestion of corn stover at mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* **136**, 574–81.

Shin, H.-S., Youn, J.-H. & Kim, S.-H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1355–1363.

Siegert, I. & Banks, C. (2005). The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* **40**, 3412–3418.

Silva, G.G.D. (2011). *Fractionnement par voie sèche de la biomasse ligno-cellulosique : Broyage poussé de la paille de blé et effets sur ses bioconversions*. University of Montpellier.

Silva, G.G.D., Rouau, X. & Stéphane, G. (2011). Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Powder Technol.* **208**, 266–270.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. & Nrel, D.C. (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *NREL Natl. Renew. energy Lab.* 1–18.

Soest, P.J. Van. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **46**, 829–835.

Soest, P.J. Van, Robertson, J.B. & Lewis, B.A. (1991). Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583–3597.

Song, H., Clarke, W.P. & Blackall, L.L. (2005). Concurrent microscopic observations and activity measurements of cellulose hydrolyzing and methanogenic populations during the batch anaerobic digestion of crystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 369–78.

Stadtman, E., Stadtman, T. & Barker, H. (1949). Tracer experiments on the mechanism of synthesis of valeric and caproic acids by Clostridium kluyveri. *J. Biol. Chem.* **178**, 677–682.

Staley, B.F., de Los Reyes, F.L. & Barlaz, M. a. (2011). Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2381–91.

Stoodley, P., Sauer, K. & Davies, D. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev.* **56**, 187–209.

Sträuber, H. & Kleinsteuber, S. (2013). Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-stage process. In *International Water Association, 13th World Congress on Anaerobic Digestion, 25 - 28 June 2013, Santiago de Compostela , Spain.*: 4. Santiago de Compostela.

Stroot, P.G., McMahon, K.D., Mackie, R.I. & Raskin, L. (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions--I. Digester performance. *Water Res.* **35**, 1804–16.

Sun, R. (2010). *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose*. *Concrete*. First edit. Amsterdam.

Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11.

Tamaki, Y. & Mazza, G. (2010). Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: Effects of extractives, particle size and crop species. *Ind. Crops Prod.* **31**, 534–541.

Team, R.D.C. (2008). R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput.* **1**.

Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M. & Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front. Microbiol.* **2**, 93.

Vaezi, M., Pandey, V., Kumar, A. & Bhattacharyya, S. (2013). Lignocellulosic biomass particle shape and size distribution analysis using digital image processing for pipeline hydro-transportation. *Biosyst. Eng.* **114**, 97–112.

Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H.M. (2009a). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **13**, 1000–1013.

Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H.M. (2009b). Alkalinity and high total solids affecting H2 production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 3639–3646.

Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparaza-Garcia, F., Cecchi, F. & Poggi-Varaldo, H. (2005a). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H2 production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy* **30**, 1383–1391.

Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Muñoz-Páez, K.M., Carmona-Martínez, A. & Poggi-Varaldo, H.M. (2006). Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H2 production from organic solid waste. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 342–9.

Valdez-Vazquez, I., Sparling, R., Risbey, D., Rinderknecht-Seijas, N. & Poggi-Varaldo, H.M. (2005b). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresour. Technol.* **96**, 1907–13.

Vandenbrink, J.P., Hammonds, R.E., Hilten, R.N., Das, K.C., Henson, J.M., Paterson, A.H. & Feltus, F.A. (2013). Tissue specific analysis of bioconversion traits in the bioenergy grass Sorghum bicolor. *Ind. Crops Prod.* **50**, 118–130.

Vandevivere, P., Baere, L. De & Verstraete, W. (2002). Types of anaerobic digesters for solid wastes. In *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*: 111–140. Mata-Alvarez, J. (Ed). Barcelona: IWA Publishing.

Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G. & Morgan, T.J. (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel* **94**, 1–33.

Vavilin, V. a & Angelidaki, I. (2005). Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 113–22.

Vavilin, V. a, Fernandez, B., Palatsi, J. & Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* **28**, 939–51.

Vavilin, V.A. & Lokshina, L.Y. (1996). Modeling of volatile fatty acids degradation kinetics and evaluation of microorganism activity. *Bioresour. Technol.* **57**, 69–80.

Vavilin, V.A., Rytov, S.V. & Lokshina, L.Y. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.* **56**, 229–237.

Veeken, A. & Kalyuzhnyi, S. (2000). Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *J. Environ. Eng.* **06**, 1076–1081.

Villemin, G. & Toutain, F. (1987). Méthode de fixation d'échantillons organo-minéraux de sols pour la microscopie électronique à transmission. In *Working Meeting of Soil Micromorphology*: 43–48. Paris: Association Française pour l'Etude du Sol.

Wang, G., Gavala, H.N., Skiadas, I. V & Ahring, B.K. (2009). Wet explosion of wheat straw and codigestion with swine manure: effect on the methane productivity. *Waste Manag.* **29**, 2830–5.

Wang, J. & Wan, W. (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 235–244.

Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H.I. & Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* **16**, 407–416.

Wang, Z., Xu, F. & Li, Y. (2013). Effects of total ammonia nitrogen concentration on solid-state anaerobic digestion of corn stover. *Bioresour. Technol.* **144**, 281–287.

Wang, Z.-W. & Chen, S. (2009). Potential of biofilm-based biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 1–18.

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J. & Jones, D.L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* **99**, 7928–40.

Watteau, F. & Villemin, G. (2001). Ultrastructural study of the biogeochemical cycle of silicon in the soil and litter of a temperate forest. *Eur. J. Soil Sci.*

Watteau, F. & Villemin, G. (2011). Characterization of organic matter microstructure dynamics during co-composting of sewage sludge, barks and green waste. *Bioresour. Technol.* **102**, 9313–7.

Wilson, J. & Mertens, D. (1995). Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.* **35**, 251–259.

Xu, F., Shi, J., Lv, W., Yu, Z. & Li, Y. (2013). Comparison of different liquid anaerobic digestion effluents as inocula and nitrogen sources for solid-state batch anaerobic digestion of corn stover. *Waste Manag.* **33**, 26–32.

Yang, S., Li, J., Zheng, Z. & Meng, Z. (2009). Lignocellulosic structural changes of Spartina alterniflora after anaerobic mono- and co-digestion. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **63**, 569–575.

Zeitun, R. (2011). *Procédés de fractionnement de la matière végétale - Application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé*. Université de Toulouse.

Zhang, B., Cai, W. & He, P. (2007a). Influence of lactic acid on the two-phase anaerobic digestion of kitchen wastes. *J. Environ. Sci. (China)* **19**, 244–9.

Zhang, B., He, P.-J., Lü, F., Shao, L.-M. & Wang, P. (2007b). Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Res.* **41**, 4468–78.

Zhang, C.-H., Ma, Y.-J., Yang, F.-X., Liu, W. & Zhang, Y.-D. (2009). Optimization of medium composition for butyric acid production by Clostridium thermobutyricum using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **100**, 4284–8.

8 ANNEXE

DISPOSITIF ET PROCÉDÉ DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLON

ABRÉGÉ DE LA DEMANDE DE BREVET (FIGURE 8-1 ET FIGURE 8-2)

Le dispositif (10) d'accès à l'intérieur d'un contenant étanche d'échantillon comporte :

- le contenant (100) comportant, sur une ouverture (115), un support (110) de vanne configuré pour permettre la fixation d'une vanne (200) d'isolement,
- la vanne d'isolement fixée sur le support de vanne du contenant et
- un moyen (300) d'accès à l'intérieur du contenant comportant :
  - un support (305) de fixation comportant un moyen de fixation (310) configuré pour être fixé sur la vanne d'isolement, une bague de guidage (315) et un joint (355) d'étanchéité entre, d'une part, le support de fixation et, d'autre part, un cylindre (320) coulissant; le cylindre étant configuré pour coulisser dans la bague de guidage de façon à pénétrer dans le contenant et comportant au moins une partie creuse (340) formant une chambre d'accès à l'intérieur du contenant étanche d'échantillon et
  - une entrée/sortie (325) munie d'un système d'étanchéité configurée pour une injection de gaz à l'intérieur du moyen d'accès de manière à en chasser un autre gaz susceptible de perturber l'environnement intérieur du contenant.

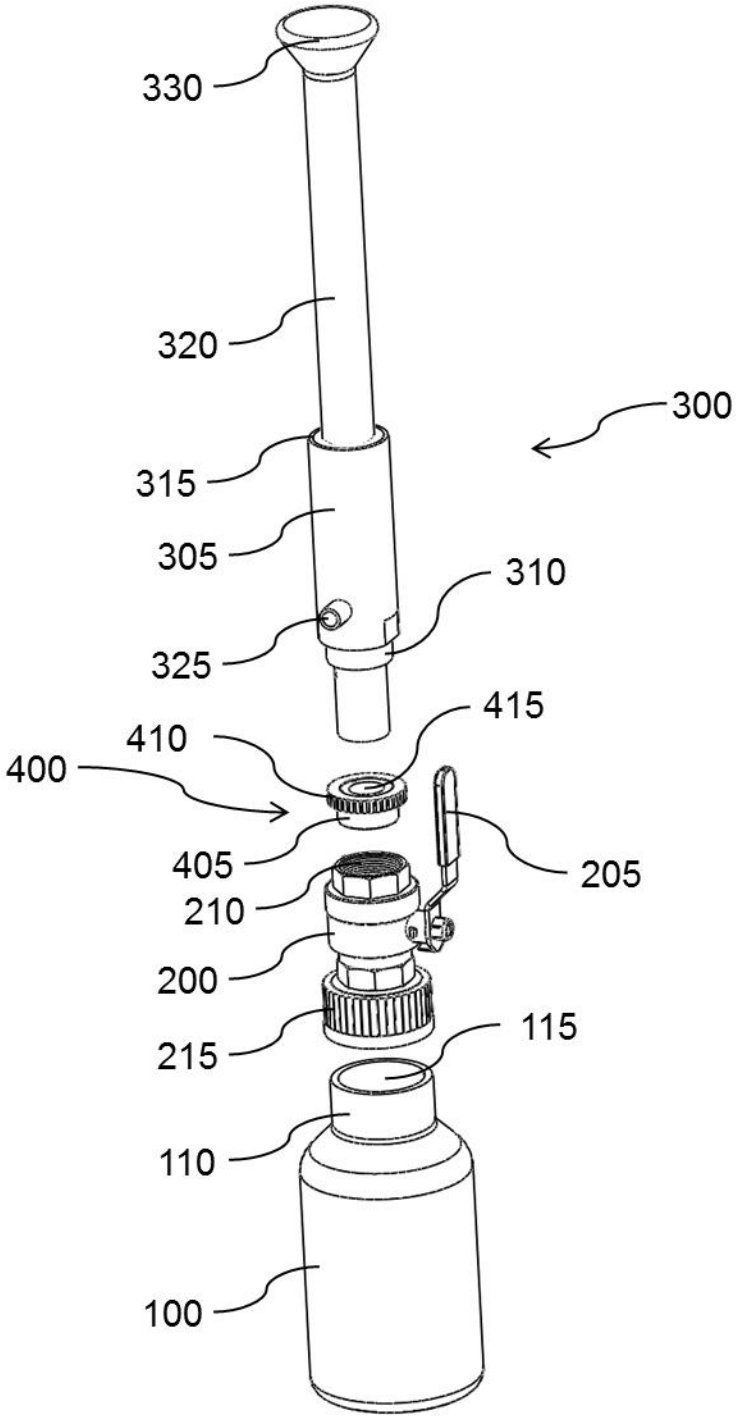


Figure 8-1 : Schéma du prototype

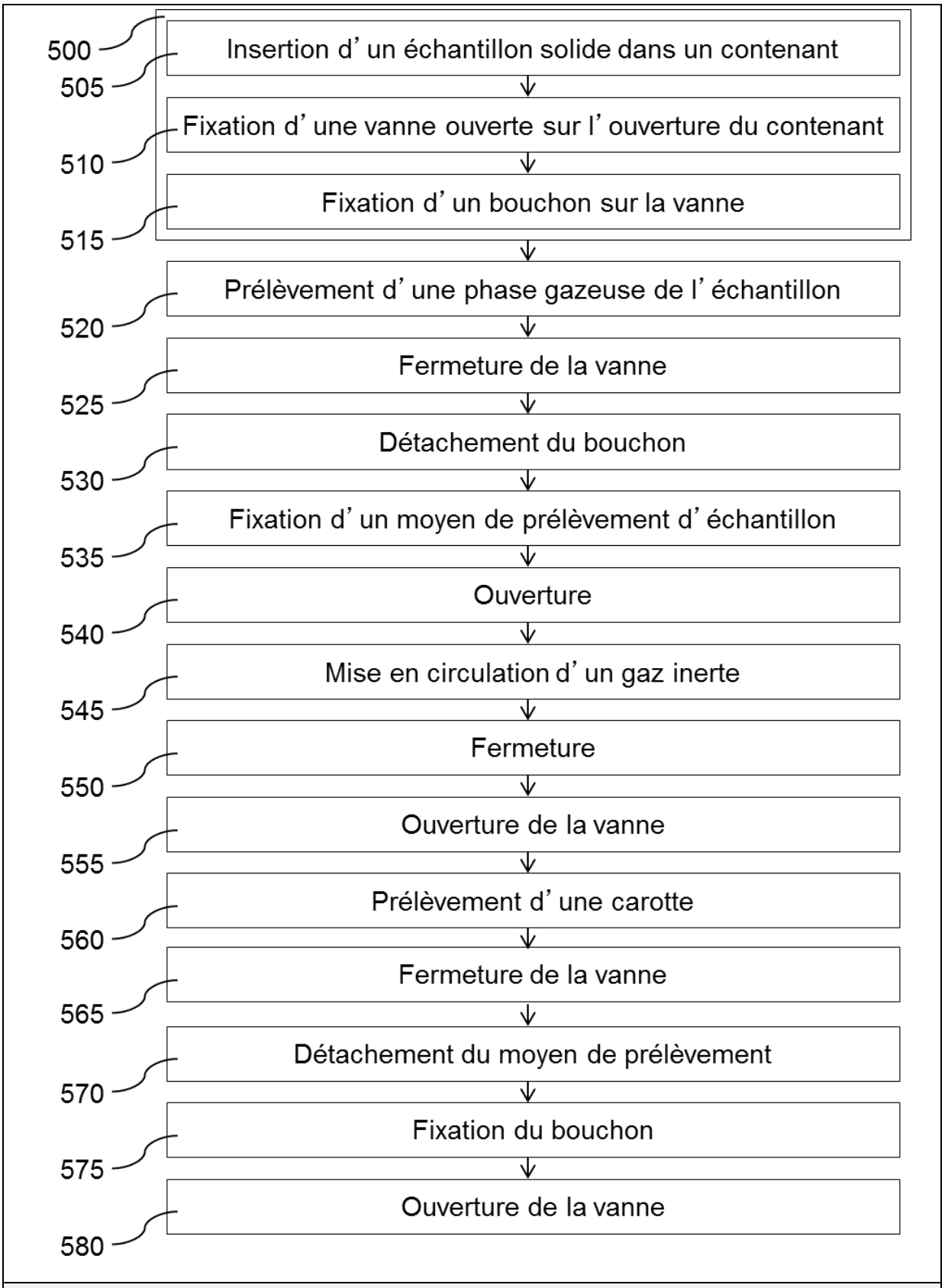


Figure 8-2 : Diagramme des opérations pour réaliser les prélèvements

ABSTRACT

Biogas processes, containing low water content, present many economical and practical advantages: low energy consumption, high loading rate, low digestate post treatments... These observations led to the development at large scale of the solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic residues, such as wheat straw. However, the digester optimization is currently limited by a lack of fundamental knowledge. The aim of this thesis is to better optimize the process degradation taking into account the effects of process parameters on the interaction between the substrate and the micro-organisms. Original strategies and innovative analytic tools were developed to allow a precise study of dry media. Results showed that water content is the main parameter that controls the process, while its start-up depends on the quantity of micro-organisms. Moreover, despite a higher risk of process failure, fine milling of the lignocellulosic residues is recommended to improve the microbial action.

DEFENDED ON 6TH NOVEMBER 2013 AT :

WITH THE FINANCIAL SUPPORT OF :

INRA
SCIENCE & IMPACT

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de recherche (UR0050) - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs
F 11100 - Narbonne
France

Tél. : + 33 (0) 4 68 42 51 51
Courriel: lbe-contact@supagro.inra.fr
www.montpellier.inra.fr/narbonne